



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical

**Autofagia não canônica em macrófagos infectados com
isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* do Distrito
Federal**

KAIO CÉSAR DE MELO GORGONHA

Brasília, DF
2018

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical

**Autofagia não canônica em macrófagos infectados com
isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* do Distrito
Federal**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Medicina
Tropical da Universidade de Brasília como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Biologia.

Orientado: Kaio César de Melo Gorgonha
Orientador: Prof. Dr. André Moraes Nicola

Julho de 2018
Brasília, DF

Ficha Catalográfica

GG667a Gorgonha, Kaio César
Autofagia não canônica em macrófagos infectados com
isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* do Distrito
Federal / Kaio César Gorgonha; orientador André Nicola.
- Brasília, 2018.
71 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2018.

1. imunologia . 2. autofagia . 3. micologia. 4.
microscopia de imunofluorescência . 5. isolado clínico. I.
Nicola, André , orient. II. Título.

DATA DA DEFESA E APROVAÇÃO DA APROVAÇÃO DE MESTRADO

21 de agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor ANDRÉ MORAES NICOLA (Presidente)

Universidade de Brasília

Professora Doutora CECÍLIA BEATRIZ FIUZA FAVALI (Membro)

Universidade de Brasília

Professora Doutora ILDINETE SILVA PEREIRA (Membro)

Universidade de Brasília

Doutor STEPHAN ALBERTO MACHADO DE OLIVEIRA (Suplente)

Universidade de Brasília

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DA CRIPTOCOCOSE.	21
FIGURA 2 - MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS VERSUS MACRÓFAGOS ATIVADOS ALTERNATIVAMENTE DURANTE A RESPOSTA IMUNE A <i>C. NEOFORMANS</i>	26
FIGURA 3 – PORCENTAGEM DE FAGOCITOSE (ESQUERDA) E ÍNDICE FAGOCÍTICO (DIREITA) DE CADA ISOLADO.	42
FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DE ESPESSURA DA CÁPSULA E QUANTIDADE DE GXM SECRETADA.	43
FIGURA 5 – MEDIDAS DE MELANIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.	44
FIGURA 6 – CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE <i>G. MELLONELLA</i> INFECTADAS COM OS ISOLADOS CLÍNICOS.	45
FIGURA 7 – EXEMPLOS DE CAMPOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM BAIXA (CNB020) E ALTA (CNB042) PORCENTAGEM DE FAGOSSOMOS LC3-POSITIVOS.	52
FIGURA 8 – PROPORÇÃO DE MACRÓFAGOS CAPAZES DE REALIZAR LAP.	53
FIGURA 9 – CORRELAÇÕES ENTRE PROPORÇÃO DE LAP E DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DOS QUAIS ISOLADOS CLÍNICOS FORAM OBTIDOS.	54
FIGURA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE MEDIDAS DE FAGOCITOSE E RECRUTAMENTO DE LC3 PARA O FAGOSSOMO CONTENDO FUNGOS.	55
FIGURA 11 - CORRELAÇÃO ENTRE MEDIDAS DE CÁPSULA E RECRUTAMENTO DE LC3 PARA O FAGOSSOMO CONTENDO FUNGOS.	55
FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE MEDIDAS DE MELANIZAÇÃO E RECRUTAMENTO DE LC3 PARA O FAGOSSOMO CONTENDO FUNGOS.	56
FIGURA 13 – CORRELAÇÃO ENTRE MEDIANA DE SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DE <i>G. MELLONELLA</i> INFECTADAS COM ISOLADOS CLÍNICOS E RECRUTAMENTO DE LC3 PARA O FAGOSSOMO CONTENDO FUNGOS.	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES A PARTIR DOS QUAIS OS ISOLADOS CLÍNICOS FORAM OBTIDOS	38
TABELA 2 – FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DE CRIPTOCOCOSE DOS PACIENTES A PARTIR DOS QUAIS OS ISOLADOS CLÍNICOS FORAM OBTIDOS	38
TABELA 3 – APRESENTAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES A PARTIR DOS QUAIS OS ISOLADOS CLÍNICOS FORAM OBTIDOS.....	39
TABELA 4 – TRATAMENTO E DESFECHO DOS PACIENTES A PARTIR DOS QUAIS OS ISOLADOS CLÍNICOS FORAM OBTIDOS....	41
TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	46
TABELA 6 – MEDIDAS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO: RECRUTAMENTO DE LC3, FAGOCITOSE E CÁPSULA	47
TABELA 7 – MEDIDAS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO: RECRUTAMENTO DE LC3, SOBREVIVÊNCIA DE <i>G. MELLONELLA</i> E MELANIZAÇÃO	49

LISTA DE ABREVIACÕES

MLST: *multi-locus sequence typing*

AFLP: *amplification fragment length polymorphism*

GXM: glicuronoxilomanana

GXMGal: glicuronoxilomanogalactana

MP: manoproteína

TARV: terapia antiretroviral

CrAg: antígeno criptocócico

CR: receptor de complemento

Fc : fração cristalizável da cadeia pesada gama

Th1/Th2/Th17: linfócitos T auxiliaries tipo 1, 2 e 17

IFN- : interferon gama

TNF : fator de necrose tumoral alfa

ROS: espécies reativas de oxigênio

ERNS: espécies reativas de nitrogênio

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LAP: *LC3-associated phagocytosis*

RCB: rede criptococose Brasil

MOPS: ácido morfolinopropanosulfônico

MM: meio mínimo

RPM: rotações por minuto

PBS: solução salina tamponada com fosfato

DMEM: *Dulbecco modified Eagle's medium*

BSA: albumina sérica bovina

NA: abertura numérica

CCD: *charge-coupled device*

L-DOPA: ácido (S)-2-amino-3-(3,4-diidróxifenil) propanóico

HIV: vírus da imunodeficiência humana

Aids: síndrome da imunodeficiência adquirida

AmB: anfotericina B

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

CGB: concanavanina, glicina, azul de bromotimol

LCR: líquido céfalo-raquidiano

BAL: lavado bronco-alveolar

LA: líquido ascítico

SGN: sangue

FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior . CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico . CNPq

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal . FAP-DF

ÍNDICE

Resumo.....	13
Introdução	14
O gênero <i>Cryptococcus</i>	14
Taxonomia.....	14
Ecologia.....	14
Fatores de Virulência.....	15
Criptococose.....	19
Epidemiologia.....	19
Diagnóstico laboratorial	20
Tratamento e estratégias de prevenção	21
Imunologia da Criptococose	21
Autofagia.....	25
A Rede Criptococose Brasil (RCB)	26
Justificativa.....	27
Objetivos	28
1.0 Métodos	29
1.1 Cepas e isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i>	29
1.2 Preparo dos pré-inóculos.....	29
1.3 Preparo de lamínulas e placas para cultivo de J774.....	29
1.4 Cultivo das células J774	30
1.5 Infecção das células J774.....	30
1.6 Preparo das lâminas para microscópio.....	31
1.7 Microscopia de Imunofluorescência.....	31
1.8 Análise das imagens de microscopia.....	32

Caracterização dos fatores de virulência dos isolados de <i>Cryptococcus</i> spp.	32
Análise estatística.....	34
Resultados	35
Coorte de pacientes com criptococose.....	35
Caracterização dos isolados clínicos.....	42
Detecção e quantificação de fagocitose associada a LC3 (LAP).....	51
Correlações com os dados clínicos dos pacientes	53
Correlações com características dos isolados.....	54
Discussão	57
Conclusões	59
Referências bibliográficas	60

Resumo

A criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Cryptococcus* que acomete principalmente pessoas com Aids. A principal manifestação clínica da doença é uma meningoencefalite severa. O tratamento desta doença é baseado atualmente em drogas intravenosas bastante tóxicas ou caras, que necessitam de internação hospitalar para administração e requerem acompanhamento laboratorial constante para manejo dos efeitos colaterais. Apesar da existência deste tratamento, se estima que aproximadamente 80% dos 223 mil casos anuais da doença levem à morte. Há evidências de que a infecção pelo fungo ocorra em todas as pessoas durante a infância; o que parece determinar a doença, portanto, é o surgimento de imunossupressão da resposta imunitária celular, o que indica que novas terapias possam ser criadas com alvo na resposta imunitária do hospedeiro. Um dos mecanismos possíveis para manipulação com fins terapêuticos da resposta do hospedeiro é a autofagia, um processo de reciclagem de material intracelular que tem sido demonstrado em experimentos *in vitro* e em modelos animais como importante também na resposta imunitária a fungos. Tendo em vista essa possibilidade de manipulação da autofagia, é necessário determinar se a autofagia é importante também na resposta imunitária humana, assim como os mecanismos pelos quais a autofagia exerce atividade antifúngica e como *Cryptococcus* evade da resposta autofágica. Para estudar o papel da autofagia na interação patógeno-hospedeiro da criptococose, nós utilizamos uma coleção de isolados clínicos de *C. neoformans* obtidos como parte do trabalho da Rede Criptococose Brasil no DF (RCB-DF). Esses isolados foram utilizados em testes *in vitro* para determinação de sua capacidade de evasão da autofagia do hospedeiro. Os resultados foram correlacionados com dados clínicos dos pacientes dos quais os isolados foram obtidos. Devido possivelmente ao grande número de isolados que seriam necessários para detectar diferenças, não conseguimos observar nenhuma. No entanto, correlações com outros fenótipos desses isolados trouxeram dados muito importantes sobre como *C. neoformans* causa doenças. Entre eles, o mais importante é a relação direta entre a capacidade de melanização de um isolado e sua capacidade de evadir da autofagia do hospedeiro, o que sugere um novo papel para a melanina de *C. neoformans*: evadir da resposta autofágica.

Introdução

O gênero *Cryptococcus*

Taxonomia

O fungo *Cryptococcus* foi identificado como um patógeno pela primeira vez por Otto Busse em 1894 e nomeado por F. Sanfelice. Primeiramente os fungos encontrados eram classificados como pertencentes a uma única espécie, mas em meados dos anos 50 eles foram distinguidos por sua característica fenotípicas antigênicas (K J Kwon-Chung, 2011). Décadas mais tarde foram descobertos estágios teleomorfos para cada uma das espécies de *Cryptococcus*, que então foram classificadas como espécies distintas com base nas análises dos genomas completos (DeSouza et al., 2011).

Com o avanço das análises moleculares, as tipagens filogenéticas foram se tornando o padrão no ramo taxonômico, estudos que utilizaram testes como o MLST e AFLP demonstraram que *C. neoformans* e as cepas de *C. gattii* eram compostas por múltiplos clados monofiléticos, sugerindo 7 tipos geneticamente diferentes (Hagen et al., 2015). O estudo propôs classificar esses 7 tipos em novas espécies, sendo duas a partir de *C. neoformans* e cinco espécies dentro do complexo *C. gattii* (Hagen et al., 2015). Outra classificação mantém *C. neoformans* com duas variedades, *C. neoformans* variedade *grubii* (Sorotipo A) e *C. neoformans* variedade *neoformans* (Sorotipo D) (Kyung J. Kwon-Chung, 2011) e ainda um híbrido (sorotipo AD) (Franzot, Salkin, & Casadevall, 1999). Já o complexo *C. gattii* possui nesta outra classificação 2 variedades, tipo B e C (Kyung J. Kwon-Chung & Varma, 2006).

Ecologia

C. neoformans e *C. gattii*, os agentes etiológicos da criptococose, são fungos de distribuição global que existem normalmente como saprófitas de solo (Kyung J Kwon-Chung et al., 2014; J R Perfect & Casadevall, 2002). Eles pertencem ao filo *Basidiomycota* e se diferenciam de outras leveduras patogênicas principalmente por possuírem uma cápsula.(Almeida, Wolf, &

Casadevall, 2015; Lin & Heitman, 2006). *C. neoformans* é a espécie mais comumente encontrada na natureza e apesar de ter sido isolado pela primeira vez em suco de pêssago, no ambiente a espécie é comumente relatada sendo associada a pombos, outras aves, guano, solo, árvores, madeira em decomposição e ao solo próximos a estes (Hagen et al., 2015)

C. neoformans também é o maior causador de infecções dentro do complexo de espécie, sendo encontrado em amostras humanas e de animais isolados clínicos e veterinários (Boulware, 2011). Em um estudo de análise genotípica feito com 2755 amostras, coletadas de 48 países dos 5 continentes povoados, 42% amostras ambientais e 69% dos isolados clínicos veterinários (n=1250) eram de *C. neoformans* (Boulware, 2011). 53% dessas cepas de origem clínica são isolados clínicos a partir de pacientes infectados pelo HIV e 16% vieram de pacientes imunocompetentes (Boulware, 2011).

O fungo é intimamente associado ao pombo comum (*Columba livia*) e a outras aves, incluindo as domésticas (Micol et al., 2007) mas devido a sua temperatura corporal ser alta além do limite de crescimento de *C. neoformans*, o fungo raramente é capaz de causar uma infecção grave em aves, se restringindo a ser causador de uma simples doença subcutânea (Malik et al., 2003).

Fatores de Virulência

Termotolerância

Existem mais de 1,5 milhão de espécies fúngicas identificadas, com a maioria das espécies crescendo em temperaturas ideais que variam de 22°C a 35°C. Apenas cerca de 270 espécies de fungos são patógenos em humanos, e são justamente esses fungos que crescem em temperatura mais alta que os demais e, por isso, são chamados de termotolerantes (John R. Perfect, 2006).

Dentro de 38 espécies criptocócicas diversas, *C. neoformans* e *C. gattii* são os únicos que conseguem crescer bem em temperaturas acima de 30°C (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Mesmo portando outros fatores de virulência importantes como cápsula e capacidade de produzir melanina, *C. podzollicus*, por exemplo, foi incapaz de sobreviver em temperaturas acima de 30°C (Kang, Kwon-Chung, Petter, Davis, & Boekhout, 2001). O simples fato de ser termotolerante, capacidade de crescer em altas temperaturas (35° - 40°) demonstra ser crucial para se causar doença invasiva.

Vários genes são necessários para o crescimento de *Cryptococcus* em temperaturas próximas à do ambiente, mas estudos demonstraram que alguns desses genes tem uma maior importância e atividade de regulação quando o fungo é exposto a altas temperaturas (Idnurm, Reedy, Nussbaum, & Heitman, 2004; Rosa e Silva et al., 2008). O fungo alcança essa regulação através de genes envolvidos na integridade da membrana, metabolismo, montagem da parede celular, splicing do pré-mRNA entre outros (Kraus et al., 2004; Liu et al., 2008).

Um gene que merece destaque quando se fala de termotolerância é o que codifica a calcineurina fosfatase dependente de Ca^{2+} /calmodulina, o gene CNA1 (Odom et al., 1997). Foi o primeiro estudo molecular envolvendo o tema, demonstrando que as cepas mutantes para o gene, eram incapazes de crescimento a 37° (Odom et al., 1997).

Enzimas hidrolíticas

Igualmente a outros fungos saprófitas, *C. neoformans* também participa da maior parte da degradação de biomassa do planeta, e para isso ele secreta diversas enzimas com a função de decompor macromoléculas no ambiente. Algumas dessas enzimas usadas tem funções importantes também durante a colonização e infecção do hospedeiro, como é o caso da fosfolipase B e da urease (Almeida et al., 2015).

A quase universalidade da presença de urease em cepas de *C. neoformans* auxilia a sobrevivência do fungo por permitir o aproveitamento de importante

fonte de nitrogênio em um nicho relevante para o fungo: excretas de pombo (Cox, Mukherjee, Cole, Casadevall, & Perfect, 2000). As atividades exercidas pela urease durante a infecção humana, são bastante variadas, como: hidrólise de membrana celular, facilitando a penetração em tecidos (Osterholzer et al., 2009); aumento do sequestro microvascular, levando uma melhor permeabilidade da barreira hematoencefálica (Olszewski et al., 2004); dificulta a depuração do fungo pelo pulmão, facilitando a propagação de fungos devido ao acúmulo de células dendríticas imaturas secundária a uma resposta não protetora do tipo Th2 (Osterholzer et al., 2009).

Cápsula

A cápsula polissacarídica é o fator de virulência mais importante e estudado de *Cryptococcus* (Kumar, Yang, Haynes, Skowrya, & Doering, 2011) .Comum em outros microorganismos como as bactérias, a presença da cápsula é uma exceção entre os fungos (McClelland, Bernhardt, & Casadevall, 2006) . Essa estrutura pode crescer até várias vezes o diâmetro da própria célula fúngica, crescendo ao seu redor ou ser lançada no ambiente. Apesar da maior parte dos estudos realizados para elucidar a estrutura da cápsula terem sido feitos utilizando os componentes coletados do meio, o que pode divergir do que é apresentado associado a célula fúngica, a capsula em volta do fungo também tem importância na patogênese (Frases, Nimrichter, Viana, Nakouzi, & Casadevall, 2008)

A cápsula é composta principalmente por dois grandes polissacarídeos repetidos implicados em virulência (Kumar et al. 2011), glucuronoxilomanano (GXM, 1-7 milhões Da) e glucuronoxilomannogalactana (GXMGal, ~100.000 Da), além de uma menor composição de ácido siálico , ácido hialurônico e manoproteínas (MP) (Frases et al., 2008). Os polissacarídeos são produzidos no complexo de Golgi (Doering, 2009) e chegam até o exterior da célula via exocitose (Doering, 2009) mediada por vesículas (Panepinto et al., 2009).

Melanina

A melanina é um pigmento amplamente conservado em todos os reinos biológicos. O termo melanina compreende um grupo heterogêneo de polímeros complexo sem uma estrutura definida, que compartilham a propriedade de ter coloração preta, marrom ou vermelha (Beltrán-García et al., 2014). A melanina não é essencial para o crescimento dos fungos, mas é conhecida por desempenhar um papel na proteção em diversas condições, entre elas: luz ultravioleta, dessecação, temperaturas extremas, ação de detergentes, radiação ionizante e substâncias oxidantes (Helene C Eisenman & Casadevall, 2012; Rosa, Almeida Vieira, Santiago, & Rosa, 2010; Zhdanova, Zakharchenko, Vember, & Nakonechnaya, 2000).

Nos fungos, a melanina pode ser produzida através de duas vias. A mais comum é a via endógena, onde a melanina é produzida a partir de uma molécula precursora chamada 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN); Os fungos do gênero *Cryptococcus*, entretanto, não possuem esta via (Helene C Eisenman & Casadevall, 2012; Lee, Jung, & Kim, 2003). Alternativamente, *C. neoformans* só se melaniza a partir de substratos exógenos (H. C. Eisenman et al., 2007). A enzima responsável pela catálise de L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-dopa) em *C. neoformans* é a lacase, capaz de oxidar compostos difenólicos em suas respectivas quinonas (Zhu, Gibbons, Garcia-Rivera, Casadevall, & Williamson, 2001). A lacase tem certa promiscuidade funcional, pois vários outros compostos já foram descritos como substrato para a enzima, gerando polímeros diversificados em seu peso molecular, cor e espessura (H. C. Eisenman et al., 2007; Garcia-Rivera et al., 2005).

Criptococose

Epidemiologia

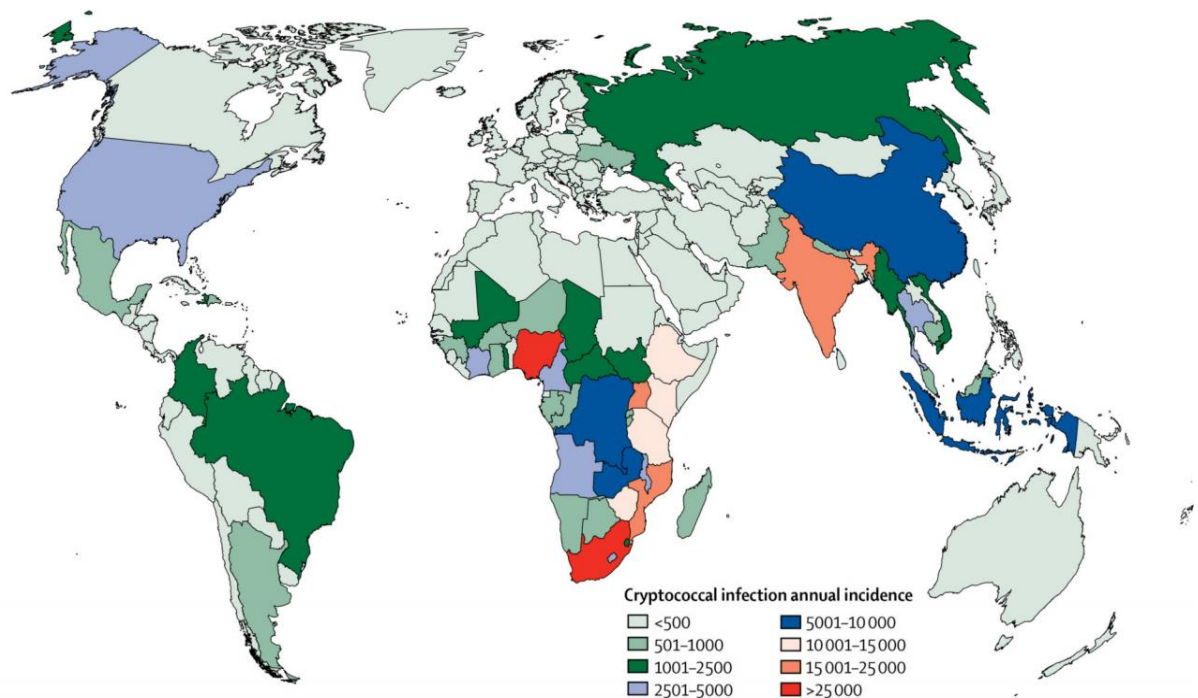


Figura 1 . Epidemiologia global da criptococose.

O número anual de pessoas positivas com antigenemia criptocócica é estimado em 278.000 (IC 95% 195 500-340 600) globalmente em 2014. Estima-se que tenham ocorrido 223.100 casos anuais de meningite criptocócica em 2014 (Rajasingham et al., 2017).

Em 2009 estimava-se que a incidência anual fosse de 957.900 casos no mundo, levando a 650.000 mortes anualmente, principalmente em países da África subsaariana (Park et al., 2009). Esses dados foram obtidos de coortes numa época em que a terapia antirretroviral (HAART) ainda não havia sido implementada com cobertura hoje observada. No período de 2003 a 2015, o acesso à TARV subiu de 1 milhão para 17 milhões de pessoas com HIV em todo mundo, cobrindo quase metade dos indivíduos adultos que vivem com HIV (Global AIDS Update 2016). Apesar da redução considerável na estimativa em relação aos dados de 2008, a criptococose continua a apresentar números alarmantes. A incidência global de criptococose é

estimada em levantamento relativo a 2014 em 223.100 casos por ano, com cerca de 181.100 mortes anuais (Rajasingham et al., 2017). Cerca de 15% das mortes em decorrência da Aids no mundo são causadas por meningite criptocócica, sendo a segunda maior causa de mortalidade associada a síndrome (Rajasingham et al., 2017).

Diagnóstico laboratorial

O teste diagnóstico mais comum para a criptococose é a microscopia direta com tinta nanquim, normalmente feita com líquido centrifugado e misturado com a tinta. No exame positivo típico, são observadas células medindo entre 3-10 µm, com uma cápsula espessa e transparente que é evidenciada com o contraste da tinta nanquim que não consegue penetrá-la. Apesar de ter baixo custo e uma sensibilidade de 60%, a técnica pode emitir resultados falso-negativos em casos de baixa carga fúngica. (Arendrup et al., 2012; Boulware et al., 2014; Dromer, Mathoulin-Pélissier, Launay, Lortholary, & Group, 2007). Outro exame diagnóstico importante na criptococose é a cultura de amostras biológicas, principalmente do líquido, em ágar Sabouraud dextrose incubadas a 30°C. A sensibilidade é de 98% em pacientes com meningite por *Cryptococcus* (Arendrup et al., 2012).

Atualmente, o mais importante teste diagnóstico se baseia na detecção do antígeno criptocócico (CrAg) através de imunoensaios. O antígeno criptocócico representa o polissacarídeo mais abundante da cápsula do fungo, a GXM, que está presente nos 4 sorotipos principais e nos híbridos do complexo de espécies de *Cryptococcus*. Uma das principais vantagens de se usar o CrAg no diagnóstico precoce é o caráter subagudo da meningite criptocócica, onde níveis do antígeno podem ser identificados 3 semanas (mediana) antes das manifestações clínicas (Micol et al., 2007). A detecção de CrAg é indispensável por causa da facilidade de acesso a amostras dos pacientes, já que o antígeno é eliminado durante a infecção nos fluidos corporais como líquido, sangue e urina. Além disso, a possibilidade de

diagnósticos onde há pouca ou nenhuma infraestrutura laboratorial, como permitem os testes baseados em imunocromatografia, torna esses testes cruciais em regiões como a África subsaariana, onde somente 28% dos pacientes têm acesso a centros de saúde moderada ou avançada (Kozel & Bauman, 2012).

Tratamento e estratégias de prevenção

A relação entre a Aids e a criptococose é tão estreita que a identificação de qualquer uma das duas doenças sempre deve ser um sinal de alerta para a suspeita da outra, e isso se estende a todo âmbito da clínica, principalmente durante o tratamento e diagnóstico. Nos EUA, por exemplo, a porcentagem de pacientes que desenvolveram a meningite criptocócica concomitante ao HIV foi de 71% (Lin & Heitman, 2006).

O tratamento antifúngico para a meningite criptocócica padrão é dividido em 3 fases, ao longo de pelo menos 1 ano. A fase I é chamada de indução, onde é utilizada a anfotericina B intravenosa durante 2 semanas. Podem ser utilizadas tanto a formulação desoxicolato (mais barata e tóxica) quanto as formulações lipídicas (menos tóxica mas mais cara) de anfotericina B. Frequentemente a anfotericina B é usada com outro antifúngico de apoio como flucitosina ou fluconazol, para aumentar a eliminação de fungos no líquido. A fase de consolidação, em que é administrado fluconazol 400 mg por dia, durante 8 semanas é a seguinte. Por fim, a de manutenção é feita com fluconazol 200 mg por dia durante vários meses (Govender & Dlamini, 2014).

Imunologia da Criptococose

Os macrófagos são considerados as mais importantes células efetoras do sistema imune na resposta contra *C. neoformans*. Estas células imunitárias

fagocitam o fungo e o contém em fagossomos, onde ele é exposto a substâncias antifúngicas como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, hidrolases e peptídios antimicrobianos (Johnston & May, 2013; Levitz et al., 1999) . Por outro lado, os macrófagos também são utilizados como nicho de sobrevivência e esconderijo do sistema imunitário do hospedeiro (Feldmesser, Tucker, & Casadevall, 2001; Johnston & May, 2013; Levitz, Nong, Mansour, Huang, & Specht, 2001).

A Infecção se inicia com a inalação de leveduras dessecadas ou basidiósporos do fungo. Nessa fase, é crucial que o hospedeiro destrua ou contenha o fungo antes que ele adquira a capacidade de se disseminar. As principais células imunes efetoras durante essa fase são os macrófagos alveolares, em virtude de serem os fagócitos mais populosos no local, e pela capacidade de reconhecer, fagocitar e apresentar os antígenos do fungo (Shao et al., 2005).

O reconhecimento no pulmão acontece através de diversos receptores imunológicos, dentre eles: 1) receptores de complemento (CRs), que identificam as células fúngicas opsonizadas por proteínas do sistema complemento (Gates & Kozel, 2006; Levitz & Tabuni, 1991); 2) receptores Fc , que podem se ligar a fungos recobertos por anticorpos IgG; 3) receptores de manose, que são receptores do tipo lectina C presentes principalmente em células dendríticas (Dan, Kelly, Lee, & Levitz, 2008) e que reconhecem manoproteínas presentes no fungo (Mansour, Latz, & Levitz, 2006).

O reconhecimento e fagocitose do fungo pelos macrófagos alveolares é marcante para o destino da infecção, pois os passos efetores para contenção do fungo pelo sistema imune estão a jusante desse evento. Após a fagocitose, existem três destinos para o fungo. No primeiro deles, o fungo é morto e eliminado; no segundo, o fungo fica latente e contido no pulmão, o que possibilita uma futura reativação; no terceiro destino, o patógeno consegue se disseminar pelo hospedeiro, até alcançar o sistema nervoso central, ao qual ele tem tropismo. Cada um desses desfechos é resultado de uma complexa

interação entre o estado imunológico do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno (Arora et al., 2005). Na maioria dos casos, o que ocorre em hospedeiros humanos saudáveis depois da fagocitose e apresentação de antígenos a células TCd4+, é a resposta protetora sendo regida por citocinas Th1/Th17. A resposta Th1 está associadas a altos índices de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Num modelo de hospedeiro imunocompetente, quando *Cryptococcus* chega aos alvéolos pulmonares, ele é reconhecido e fagocitado por macrófagos alveolares (Giles, Dagenais, Botts, Keller, & Hull, 2009).

Uma das principais ferramentas que o macrófago do tipo M1 utiliza na defesa anti-criptocócica é a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs, respectivamente) (Ding, Nathan, & Stuehr, 1988). Para se produzir EROs, o macrófago precisa de uma modulação positiva na atividade da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (Lu et al., 1996). Enquanto isso macrófagos alternativamente ativados, também chamados de macrófagos M2, têm uma resposta contra infecção de parasitas, mas não protetora contra *Cryptococcus* (Anthony et al., 2006; Davis et al., 2013). Essa polarização é não-protetora, pois os macrófagos M2 regulam positivamente a enzima arginase (Arg-1). Esta enzima utiliza o substrato L-arginina para uma via que não é antifúngica, diferente da ativação clássica, onde a L-arginina é utilizada para produção de espécies reativas de oxigênio.

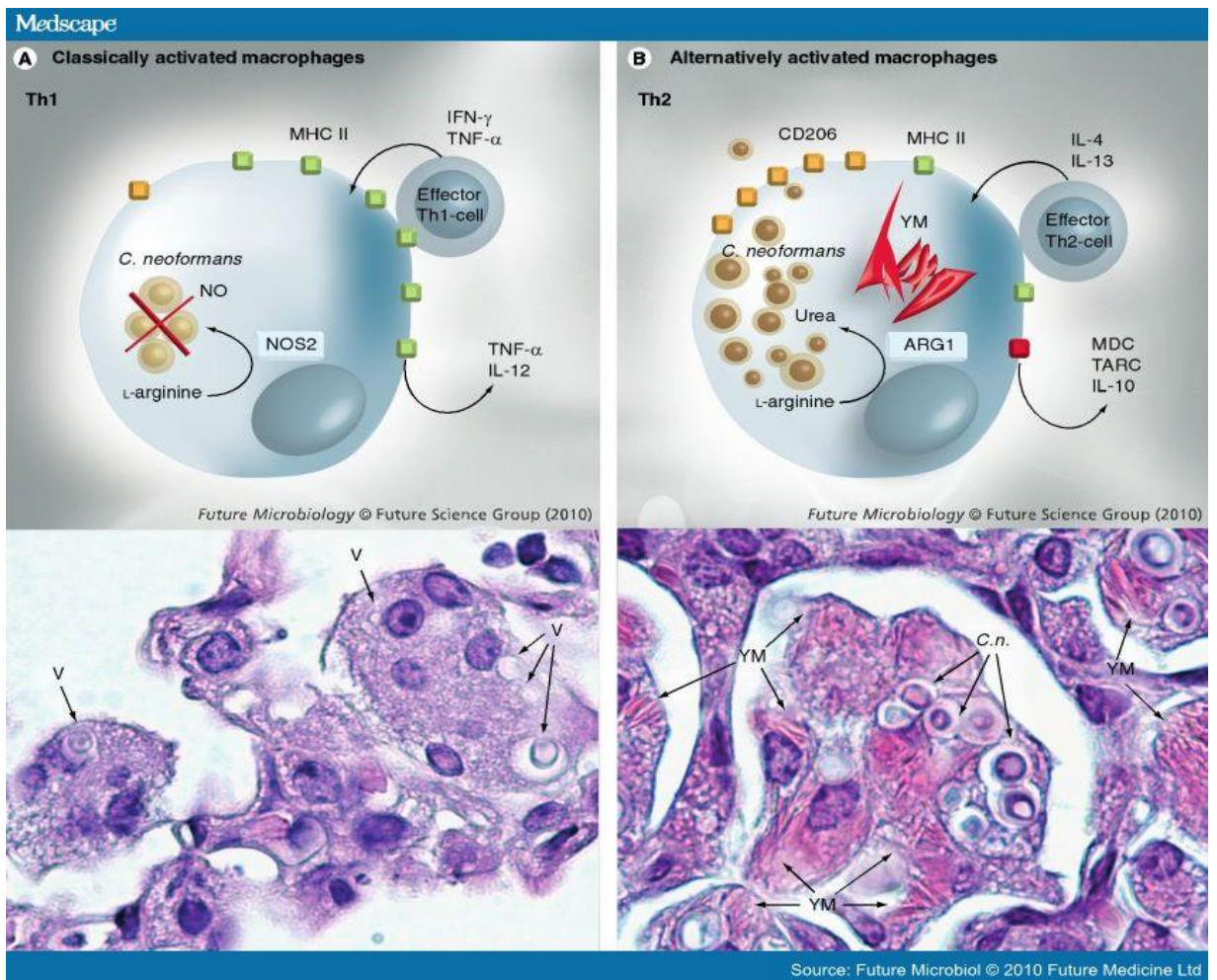


Figura 2 - Macrófagos classicamente ativados versus macrófagos ativados alternativamente durante a resposta imune a *C. neoformans*. (Olszewski ,2010)

(A) Os macrófagos tornam-se classicamente ativados durante a resposta protetora de Th1 a *C. neoformans* via estimulação de IFN- γ . Os macrófagos classicamente ativados regulam a enzima NOS2 para produzir Óxido Nítrico (NO) fungicida a partir da L-arginina e matar o microorganismo. Os macrófagos classicamente ativados produzem citocinas pró-inflamatórias e regulam positivamente o MHC II para facilitar a interação com as células Th1.

(B) Macrófagos ativados alternativamente induzidos por Th2 regulam o ARG1, que a partir de L-arginina produz ureia, uma fonte de nitrogênio facilmente disponível para *C. neoformans*. Os macrófagos alternativamente ativados induzem proteases da família das quitinases, YM1 e YM2, que formam cristais implicados na patologia pulmonar e as quimiocinas pro-Th2 MDC e TARC e CD206 (receptor de manose); isso leva ao aumento da fagocitose e crescimento intracelular de *C. neoformans*. Adaptado de (Michal A Olszewski; Yanmei Zhang; Gary B Huffnagle, 2015).

Autofagia

Dada a importância dos macrófagos na resposta imune contra *C. neoformans*, se torna essencial entender quais os mecanismos utilizados na defesa contra este fungo oportunista. Estudos realizados na última década sugerem que macrófagos utilizam a autofagia na resposta imune a patógenos intracelulares (Levine, 2005). Conservada em todos os eucariotos, a autofagia é usada pela célula para reciclar materiais citoplasmáticos, desde proteínas até organelas inteiras (Mizushima, 2007). O processo de autofagia se inicia com a formação de uma estrutura chamada fagóforo, uma vesícula que gradualmente cresce em forma de lua crescente englobando o material a ser reciclado em um compartimento envolto por duas bicamadas lipídicas. Esta vesícula, chamada autofagossomo, se funde então com lisossomos, que degradam o material em seu interior e permitem sua reutilização (Mizushima, 2007).

Classicamente, a autofagia nas células de mamíferos podem ser divididas em 3 tipos: macroautofagia, feita a partir de formação de uma vesícula de uma dupla membrana e autofagossomo para receber e transportar o material até o lisossoma; autofagia mediada por chaperonas, que transporta proteínas desdobradas diretamente para lisossomas; microautofagia, que captura a carga diretamente através da invaginação da membrana lisossomal. A maquinaria melhor conhecida atualmente é a macroautofagia, que nesse trabalho vai ser referida apenas como autofagia. A autofagia pode ser desencadeada a partir de falta de nutrientes e energia, a fim de degradar componentes citoplasmáticos para reutilização de moléculas e geração de energia. Um componente crucial da maquinaria celular de autofagia é a LC3. Essa proteína existe na forma citoplasmática (LC3-I) e associada à membrana (LC3-II), e sua função está ligada à fase de expansão da membrana de formação do autofagossomo (Geng & Klionsky, 2008).

A Rede Criptococose Brasil (RCB)

A criptococose no Brasil tem alta taxa de letalidade, com 45 a 65% dos casos resultando em óbito; além disso, há várias particularidades epidemiológicas como doença em crianças e grande incidência de infecção por *C. gattii* (Severo, Xavier, Gazzoni, & Severo, n.d.). Com base nessa grave realidade, foi criada a Rede Criptococose Brasil (RCB), uma rede de pesquisadores, médicos e profissionais de saúde pública presente em 19 estados do Brasil e liderada pela Fiocruz do Rio de Janeiro. No Distrito Federal esta rede foi implantada em 2014 e é atualmente coordenada pelo prof. Dr. André Moraes Nicola, docente do programa de pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília-UnB e orientador desta dissertação. Os trabalhos da RCB no DF já se encontram em pleno funcionamento, com autorização do conselho de ética em pesquisa da Fepecs e em fase de recrutamento de pacientes. O presente projeto faz parte da RCB e funciona paralelamente com o trabalho de outros estudantes e pesquisadores. Uma parte da equipe coleta e analisa dados clínicos e demográficos dos pacientes, enquanto outra parte da equipe mensura em laboratório diferentes parâmetros dos isolados de *Cryptococcus* spp. relacionados a virulência fúngica e interação patógeno-hospedeiro.

Justificativa

C. neoformans é um fungo cosmopolita, sua presença ocorre em diversos substratos orgânicos, frequentemente associa-se a habitat de aves e suas fezes, madeira em decomposição e não o bastante, também é encontrado em até 50 % das amostras de poeira domiciliar (Swinne, Deppner, Laroche, Floch, & Kadende, 1989). A criptococose era uma infecção rara, mas após o início dos anos 80 ela se tornou cada vez mais frequente. Este aumento deve-se ao constante avanço da medicina moderna que permite a sobrevivência de pacientes com o sistema imune debilitado como a de indivíduos transplantados, portadores de câncer em quimioterapia e principalmente a pandemia da Aids. Cerca de três quartos dos casos de criptococose associados à Aids se desenvolvem quando a contagem de T CD4 está abaixo de 50 células por mm³ (Pinner, Hajjeh, & Powderly, 1995). Outro estudo feito com 64 isolados clínicos de *C. neoformans* mostrou que estirpes com alto índice de fagocitose por macrófagos e com pouca proliferação intracelular *in vitro* foram as cepas que apresentavam alta carga fúngica no líquido cefalorraquidiano; este estudo também demonstrou que estirpes com altas taxas de internalização em macrófagos eram hipocapsulares, apresentavam uma melhor atividade da enzima lacase e eram mais resistentes ao tratamento antifúngico nos pacientes (Sabiiti & May, 2012).

Estes são só alguns dos resultados que mostram que a interação patógeno-hospedeiro tem uma relação íntima com a apresentação clínica e gravidade da doença. Com um tratamento farmacológico caro, tóxico e em muitos casos ineficaz, fica cada vez mais evidente a necessidade de se estudar as numerosas estratégias que o fungo tem para escapar do sistema imune e se replicar dentro do fagócito, bem como quais são os possíveis alvos imunomodulatórios que podem fazer com que o sistema imune monte uma resposta protetora para o paciente

Objetivos

Os objetivos gerais deste projeto são determinar se a atividade antifúngica da autofagia de macrófagos é importante na criptococose humana e quais os mecanismos pelos quais *C. neoformans* inibe a autofagia das células hospedeiras. Para atingir estes objetivos, nos concentramos em três objetivos específicos:

1. Medir a porcentagem de células de *C. neoformans* internalizadas que se localizam em autofagossomas após a fagocitose por macrófagos para cada isolado clínico.
2. Correlacionar as medidas quantitativas de susceptibilidade à autofagia acima com características dos pacientes dos quais cada isolado clínico foi obtido.
3. Correlacionar as medidas quantitativas de susceptibilidade à autofagia acima com fenótipos de virulência e comparar a patógeno-hospedeiro de cada isolado clínico.

Métodos

Cepas e isolados clínicos de *Cryptococcus*

Foram utilizados neste trabalho 23 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública do DF (Lacen-DF). Além destes isolados clínicos, foi utilizada a cepa laboratorial H99 (*C. neoformans* var. *grubii*, tipo molecular VNI). Esses fungos foram mantidos em estoque congelado a -80°C em glicerol 35%.

Preparo dos pré-inóculos

Para obtenção de colônias isoladas, os estoques foram descongelados e semeados em placas de ágar Sabouraud incubadas a 30°C por 72h. Pré-inóculos foram feitos a partir de colônias isoladas escolhidas aleatoriamente e incubadas em 5 mL de meio líquido Sabouraud em tubos cônicos de 50 mL. Os tubos cônicos contendo os isolados foram incubados em agitador orbital 250 RPM e 37°C por 72 h.

Após as 72 h, as culturas foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 15min. Em seguida, os precipitados contendo os isolados foram ressuspensos em 1 mL de PBS e transferidos para microtubos de 2 mL com fundo arredondado. Foram feitas 2 lavagens com PBS e centrifugações a $1000 \times g$ entre elas. Após as lavagens, os isolados foram diluídos 1000 vezes em PBS e contados em câmara de Neubauer. Foram contados 4 quadrantes externos da câmara e a fórmula utilizada para a contagem foi: $((Q1+Q2+Q3+Q4)/4) \times \text{fator de diluição} \times 10^4$. Os isolados foram normalizados para uma concentração final de 2×10^7 e utilizados 800.000 fungos por poço no experimento de infecção da linhagem de macrófagos J774.

Preparo de lamínulas e placas para cultivo de J774

Estruturalmente, o objetivo do experimento é fornecer uma estrutura onde células J774 cresçam e se fixem em lamínulas de vidro de 13 mm, para que logo após isso, sejam incubadas com as diversas amostras de *Cryptococcus* spp, criando assim um ambiente de interação patógeno-hospedeiro. E para criar esse ambiente, escolhemos placas de cultivo de células de fundo chato

com 24 poços, pois comportam as lamínulas de forma estável por ter um diâmetro de 15,4mm, sendo necessária pouco mais de 150 µl meio para cobrir a lamínula.

Lâminas comuns de microscopia e lamínulas circulares de 13mm de diâmetro foram lavadas 3 vezes antes do uso. As lâminas e lamínulas foram submergidas com detergente Extran 50% aquecido a aproximadamente 90°C por 10 min. Em seguida, as lamínulas foram enxaguadas em água destilada. Após o enxague, as lâminas e lamínulas foram incubadas em HCl 5% e aquecidas da mesma forma por 10 min. Finalmente, as lamínulas foram enxaguadas em água destilada e etanol 70%, secas em papel filtro e autoclavadas a 121°C por 30 min. Em seguida, as lamínulas circulares foram colocadas assepticamente dentro dos poços das placas de 24 poços para evitar contaminação.

Cultivo das células J774

Macrófagos J774 A.1 obtidos do laboratório do Dr. Arturo Casadevall (Johns Hopkins University, EUA) foram mantidos em placas de Petri de cultivo celular. Para montar o experimento as células J774 foram cultivadas em placas tratadas até atingirem uma confluência de 90%, quando foram então tripsinizadas, centrifugadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em cada um dos poços das placas de 24 poços (já contendo as lamínulas de 13mm). Foram utilizados um total de 2×10^5 células por poço, de forma a ter aproximadamente 4×10^5 células em cada lamínula, após 24 horas de incubação.

Infecção das células J774

24 horas após a preparação das placas para cultivo de células, as células dobraram sua quantidade e se aderiram as lamínulas que estão no fundo de placa de maneira estável. Os fungos, preparados anteriormente, foram incubados com o anticorpo opsonizante 18B7 a 10 µg/ml por 10 minutos e logo após foram adicionados a placa de 24 poços para a interação com os macrófagos, numa estufa de CO₂ por 12 horas a 37°C. Cada poço continha

em um volume final de 400 μL : meio DMEM, 8×10^5 células de *Cryptococcus* spp., anticorpo 18B7 numa concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 4×10^5 células J774 aderidas a uma lâmina de 13mm.

Preparo das lâminas para microscópio

Após as 12 horas de infecção, nós fixamos os macrófagos à lâmina com metanol absoluto a -20°C , em geladeira por 10 minutos. Depois de fixada, as lâminas foram incubadas sequencialmente com dois anticorpos a 37°C por 1 hora cada. O anticorpo primário é o Rabbit IgG anti-LC3-beta, que se liga às moléculas do marcador de autofagossomos LC3 das células J774. O anticorpo secundário utilizado foi Goat anti-Rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 488. Antes após cada um desses passos os poços foram lavados 2 vezes com PBS. Os anticorpos foram preparados com a diluição de 1:1000 em solução de Bloqueio (BSA a 1% em PBS).

Depois de fixar e corar, as lâminas foram retiradas dos poços com ajuda de pinças cirúrgicas e logo em seguida elas montadas em lâminas de microscopia de 26 X 76 mm. O meio de montagem utilizado foi o ProLong® Gold Antifade, que protege a amostra por meses e impede a fotodegradação.

Microscopia de Imunofluorescência

As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência Zeiss AxioObserver Z1 equipado com objetiva 63x Plan-Apochromat NA 1,4 de imersão em óleo, câmera de CCD AxioCam MRm e motorização do foco. As imagens foram coletadas por meio do software Zeiss ZEN Blue 2. Seguem parâmetros importantes da aquisição de imagens:

Binning: 2 x 2

Dimensões dos voxels: x = 0,205 μm ; y = 0,205 μm ; z = 1,000 μm

Número de fatias na direção z: 21

Optovar: 1x

Análise das imagens de microscopia

Durante a observação das lâminas no microscópio, foram adquiridas imagens de campos onde pelo menos 3 macrófagos haviam fagocitado pelo menos 1 fungo cada um. Para cada isolado foram capturados pelo menos 100 eventos de fagocitose, o que gerou uma média de 18 campos adquiridos por isolado. Em cada um desses campos, foram quantificados macrófagos que fagocitaram e macrófagos que não fagocitaram leveduras. Para cada macrófago que fagocitou foi contado também a quantidade de fungos internalizados. Estes dados permitiram a quantificação da porcentagem de fagocitose (proporção de macrófagos com pelo menos um fungo internalizado dentre todos os macrófagos observados) e o índice fagocítico (número médio de células de *Cryptococcus* spp. dentro dos macrófagos que fagocitaram pelo menos uma levedura).

Além dos dados de fagocitose, foram também obtidos dados de quantificação de recrutamento de LC3 para os fagossomos contendo os fungos. Em cada macrófago com pelo menos uma levedura fagocitada, o número de fungos recobertos por LC3 foi contado. Isso permitiu a obtenção da porcentagem de macrófagos em que pelo menos um dos fungos fagocitados é LC3-positivo e a porcentagem de macrófagos em que todos os fungos internalizados são LC3-positivos.

Caracterização dos fatores de virulência dos isolados de *Cryptococcus* spp.

Como explicado anteriormente, o presente trabalho faz parte de um projeto de uma grande equipe com vários outros estudantes e pesquisadores. Além das medidas relacionadas à autofagia descritas acima, diversos outros fenótipos estão sendo medidos. Em princípio esses outros fenótipos fazem parte de projetos de pesquisa de outros alunos e estão sendo usados neste trabalho em colaboração. Seguem abaixo descrições breves sobre como foram feitos e os créditos aos colaboradores que fizeram estes experimentos.

- Cápsula. Culturas de cada isolado clínico foram inoculadas em três meios de cultura diferentes: a) Sabouraud, um meio complexo e rico em que a cápsula não é induzida; b) Sabouraud diluído dez vezes com MOPS 50 mM pH 7,3 (Sab-MOPS), um meio de indução de cápsula; c) meio mínimo (MM), um meio quimicamente definido que também é indutor do crescimento capsular. Após 24 h em cada meio, as células coradas com tinta Nanquim foram fotografadas por microscopia e a espessura das cápsulas medida a partir das imagens. Estes experimentos foram realizados por Stefânia Frazão, Camila Rosa e Emãnuella Garcez.
- GXM secretada. Culturas de cada isolado clínico foram crescidas em meio mínimo por três dias. Em seguida, o sobrenadante de cada cultura foi coletado por centrifugação e usado em testes imunoenzimáticos (ELISA) de captura usando um par de anticorpos que reconhece especificamente o polissacarídeo capsular GXM. Com auxílio de uma curva-padrão feita com concentrações conhecidas de GXM purificada, é possível quantificar a concentração do carboidrato no sobrenadante. Como há variação entre as placas de ensaio imunoenzimático, os valores encontrados para cada isolado foram normalizados pelos valores determinados para a cepa H99, presente em todas as placas. Estes experimentos foram feitos por Camila Rosa e pelo autor deste projeto.
- Melanização. Colônias de cada um dos isolados clínicos foram crescidas em meio mínimo solidificado com ágar e suplementado com o precursor de melanina L-DOPA. Cada colônia foi criada com o mesmo número total de células, 10^5 . As placas foram incubadas a 30°C e fotografadas a cada 12 h durante 7 dias. As fotos foram então processadas em computador para quantificação de quão escura estava cada colônia em cada tempo. O tom escuro das colônias foi mensurado pela mediana de valor dos pixels em uma imagem preto-e-branca,

sendo o valor 0 correspondente a branco e o valor 255 correspondente a completamente preto.

- Virulência em *Galleria mellonella*. As larvas deste lepidóptero são um importante modelo animal alternativo para estudo de virulência de *Cryptococcus* spp. Uma colônia das larvas é mantida no Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Grupos de larvas foram infectadas com a mesma quantidade de células de cada um dos isolados (12 larvas por isolado), e a sobrevivência foi acompanhada diariamente.

Análise estatística

Para estatística descritiva, os dados foram tabulados inicialmente com Microsoft Excel e em seguida transferidos para o software GraphPad Prism, onde foram feitos histogramas. Correlações entre variáveis clínicas e dos isolados foram feitas no GraphPad Prism com o método de Pearson, no caso de duas variáveis de intervalo com distribuição normal, ou com o método de Spearman, no caso de variáveis não-paramétricas.

Resultados

Coorte de pacientes com criptococose

Foram utilizados neste trabalho 23 isolados clínicos de *Cryptococcus*, advindos de pacientes diagnosticados com criptococose e com cultura positiva. A Tabela 1 traz informações demográficas sobre estes pacientes. Dos 23 pacientes, 16 (69,6%) eram homens e 7 (30,4%) eram mulheres. A idade dos pacientes variou de 6 a 85 anos, com média de 42,1 e mediana de 43 anos. Um paciente (4,3%) era uma criança, 8 (34,8%) eram adultos jovens (19-40 anos), 11 (47,8%) eram adultos (41-60 anos) e 3 (13,1%) eram idosos (mais de 60 anos). Foi possível determinar a naturalidade de 13 dos 23 pacientes, e somente dois nasceram em Brasília. Dos 22 cuja procedência pode ser identificada, 10 vieram de Brasília. Outros 9 vieram de Goiás, 2 da Bahia e 1 de Minas Gerais.

Os fatores de risco para desenvolvimento de criptococose nestes pacientes estão descritos na Tabela 2. O principal fator de risco foi a infecção por HIV, presente em 19 (82,6%) pacientes. Três (13,0%) pacientes foram testados e não eram positivos para HIV, enquanto não havia informação sobre sorologia para HIV para um paciente. Dentre os 19 pacientes HIV-positivos, havia informação sobre a última contagem de linfócitos T CD4 para 11 deles; as contagens variaram de 19 a 253 células por mm³, com mediana de 95 células por mm³. Dos três pacientes HIV-negativos, somente um tinha fator de risco conhecido: terapia com corticoide sistêmico.

Aspectos importantes da apresentação clínica da doença nos 23 pacientes são mostrados na Tabela 3. Em sete dos 23 pacientes foi possível obter informações sobre a pressão de abertura do líquido; as medidas variaram de 24 a 80 cmH₂O, com mediana de 26 cmH₂O. Associando-se a critérios de medida da pressão de abertura (> 25 cmH₂O) outros critérios de hipertensão intracraniana, 6 pacientes (26,1%) tinham este critério de gravidade. Doze

pacientes tinham outros critérios de mau prognóstico, como confusão mental, rebaixamento do nível de consciência ou déficits neurológicos focais.

Detalhes do tratamento recebido pelos pacientes e do desfecho de seus casos são mostrados na Tabela 4. A maior parte dos pacientes (17 dos 23) recebeu anfotericina B; destes, 3 receberam somente anfotericina B desoxicolato, 8 somente formulações lipídicas e 6 receberam ambas as formulações da droga. Três pacientes não receberam anfotericina B por terem morrido pouco tempo após o diagnóstico, e para os outros três não foram encontradas informações sobre o tratamento.

Dos 23 pacientes, 13 (56,5%) morreram durante o período de acompanhamento do estudo. Oito receberam alta após cura da criptococose, um foi perdido o acompanhamento enquanto ainda estava vivo e de outro não conseguimos informações sobre o desfecho. Entre os que morreram, o tempo decorrido entre o diagnóstico confirmatório e a morte variou de 0 a 185 dias, com mediana de 11 dias e média de 41,5 dias. Dos 21 pacientes sobre os quais há informação sobre o desfecho, 8 morreram em até 14 dias e 10 morreram em até 70 dias. Portanto, a letalidade em 2 semanas foi de 38,1% e a letalidade em 10 semanas foi de 47,6%.

Tabela 1 . Dados demográficos dos pacientes a partir dos quais os isolados clínicos foram obtidos

Paciente	Isolado	Sexo	Idade (a)	Procedência	Naturalidade
1	CNB013	Masculino	42	Brasília-DF	Posse-GO
2	CNB015	Masculino	48	Novo Gama-GO	Maranhão
3	CNB016	Masculino	32	Brasília-DF	Uberlândia-MG
4	CNB020	Masculino	57	Valparaíso-GO	*
5	CNB021	Masculino	21	Brasília-DF	Matões- MA
6	CNB022	Masculino	43	Brasília-DF	Brasília-DF
7	CNB023	Masculino	43	Simolândia-GO	Carinhanha-BA
8	CNB024	Feminino	24	Brasília-DF	Brasília-DF
9	CNB025	Masculino	6	Cavalcante-GO	Campos Belos-GO
10	CNB026	Feminino	32	Brasília-DF	Maranhão
11	CNB027	Feminino	51	Buriti-BA	*
12	CNB029	Feminino	55	Bom Jesus da Lapa-BA	*
13	CNB030	Masculino	69	Brasília-DF	Maranhão
14	CNB032	Masculino	85	*	*
15	CNB034	Masculino	50	São João Del Rei-MG	Abadiânia-GO
16	CNB035	Masculino	21	Santo Antônio do Descoberto-GO	*
17	CNB036	Feminino	52	Novo Gama-GO	*
18	CNB040	Masculino	44	Águas Lindas de Goiás-GO	*
19	CNB042	Feminino	20	Brasília-DF	*
20	CSB002	Feminino	45	Brasília-DF	*
21	CSB003	Masculino	66	Valparaíso de Goiás- GO	Salgueiro-PE
22	CSB004	Masculino	34	Novo Gama- GO	Luziânia-GO
23	CUB001	Masculino	28	Brasília-DF	*

* Dados não disponíveis

Tabela 2 . Fatores de risco para desenvolvimento de criptococose dos pacientes a partir dos quais os isolados clínicos foram obtidos

Paciente	Isolado	Status HIV	CD4 (mm ³)	Outro fator de risco?
1	CNB013	Positivo	95	Não
2	CNB015	Positivo	67	Não
3	CNB016	Positivo	128	Não
4	CNB020	Positivo	140	Não
5	CNB021	Positivo	36	Não
6	CNB022	Positivo	206	Não
7	CNB023	Negativo	-	Não
8	CNB024	Positivo	19	Não
9	CNB025	Negativo	-	Não
10	CNB026	Positivo	*	Não
11	CNB027	Positivo	*	Diabetes
12	CNB029	Positivo	*	Não
13	CNB030	Negativo	-	Corticoterapia
14	CNB032	*	*	*
15	CNB034	Positivo	253	Não
16	CNB035	Positivo	*	Não
17	CNB036	Positivo	*	Não
18	CNB040	Positivo	*	Não
19	CNB042	Positivo	*	Não
20	CSB002	Positivo	49	Não
21	CSB003	Positivo	*	Não
22	CSB004	Positivo	24	Não
23	CUB001	Positivo	146	Não

* Dados não disponíveis

Tabela 3 . Apresentação clínica dos pacientes a partir dos quais os isolados clínicos foram obtidos

Isolado	Pressão de abertura (cmH ₂ O)	Hipertensão intracraniana	Confusão mental	Rebaixamento do nível de consciência	Déficits neurológicos focais
CNB013	24	Não	*	*	*
CNB015	*	*	Sim	Sim	*
CNB016	*	*	*	*	Sim
CNB020	*	*	*	*	*
CNB021	*	*	*	*	*
CNB022	*	*	*	*	*
CNB023	*	Sim	*	*	Sim
CNB024	*	*	Sim	*	*
CNB025	*	Não	*	*	*
CNB026	*	*		*	*
CNB027	26	Sim	Sim	Sim	*
CNB029	55	Sim	*	*	*
CNB030	25	Sim	Sim	*	*
CNB032	*		*	*	*
CNB034	*	*	*	*	*
CNB035	80	Sim	*	*	Sim
CNB036	*	*	*	*	*
CNB040	*	*	Sim	*	*
CNB042	*	*	*	*	Sim
CSB002	24	*	*	*	Sim
CSB003	*	Não	*	*	Sim
CSB004	30	Sim	*	*	Sim
CUB001	*	Não	*	*	*

* Dados não disponíveis

Tabela 4 . Tratamento e desfecho dos pacientes a partir dos quais os isolados clínicos foram obtidos

Paciente	Isolado	AmB desoxicolato	AmB lipídica	Fluconazol associado?	Desfecho	Tempo para desfecho (d)
1	CNB013	X	X	X	Alta	32
2	CNB015		X	X	Alta	26
3	CNB016	X			Alta	20
4	CNB020				Morte	5
5	CNB021	X			Alta	70
6	CNB022				Alta	*
7	CNB023	X	X		Morte	126
8	CNB024	X	X	X	Alta	25
9	CNB025				Morte	0
10	CNB026				Morte	4
11	CNB027	X			Morte	3
12	CNB029	X	X		Morte	37
13	CNB030	X	X		Alta	45
14	CNB032				*	*
15	CNB034		X		Morte	98
16	CNB035		X	X	Morte	3
17	CNB036		X	X	Morte	11
18	CNB040		X	X	Morte	14
19	CNB042		X		Morte	2
20	CSB002		X	X	Morte	185
21	CSB003				Perda de acompanhamento	3
22	CSB004	X	X		Morte	52
23	CUB001		X		Alta	61

* Dados não disponíveis

Caracterização dos isolados clínicos

Os 23 isolados clínicos foram testados em diversos experimentos para quantificação de parâmetros associados à interação patógeno-hospedeiro. Quando co-incubados com macrófagos na presença de anticorpos IgG1 opsonizantes, todos foram fagocitados. As taxas de fagocitose, no entanto, variaram bastante, com porcentagem de fagocitose variando de 10,5% a 41,1% (mediana de 20,15%) e índice fagocítico variando de 1,36 a 3,45 (mediana de 2,22). No histograma com os valores de porcentagem de fagocitose (Figura 3), pode-se perceber dois isolados com valores atípicos em cada extremo da distribuição.

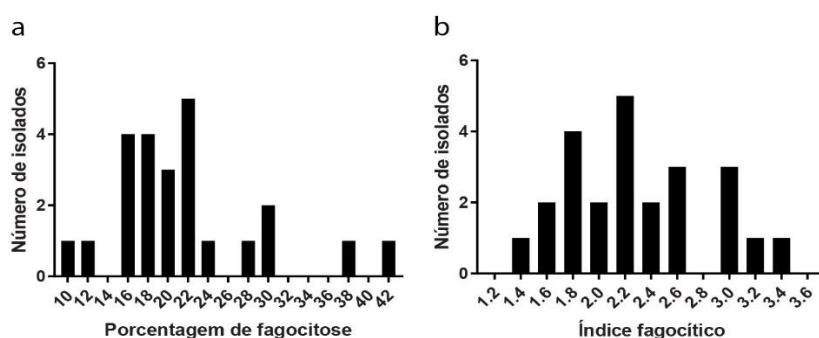


Figura 3 . Porcentagem de fagocitose (a) e índice fagocítico (b) de cada isolado.

Células J774 infectadas com os isolados em proporção 1:2 (J774:*Cryptococcus*) foram fotografadas em microscópio. A partir das imagens foi determinada a porcentagem de fagocitose (esquerda) e o índice fagocítico (direita).

Já em termos de medidas de cápsula (Figura 4), os isolados que foram cultivados em meio Sabouraud apresentaram espessura que variou de 1.24 a 1.89 μm (mediana de 1,50 μm). O meio Sab-MOPS foi o que mais induziu o aumento da espessura capsular, gerando cápsulas de até 3,84 μm (mediana de 2,76 μm). Já o meio mínimo (MM) aumentou a espessura para até 3,15 μm , com mediana de 2,62 μm . Os isolados também foram analisados com base na quantificação de GXM secretada. A análise feita por Elisa e

normalizada pela quantidade secretada por H99 variou de 0,56 a 7,43, com mediana de 1,22.

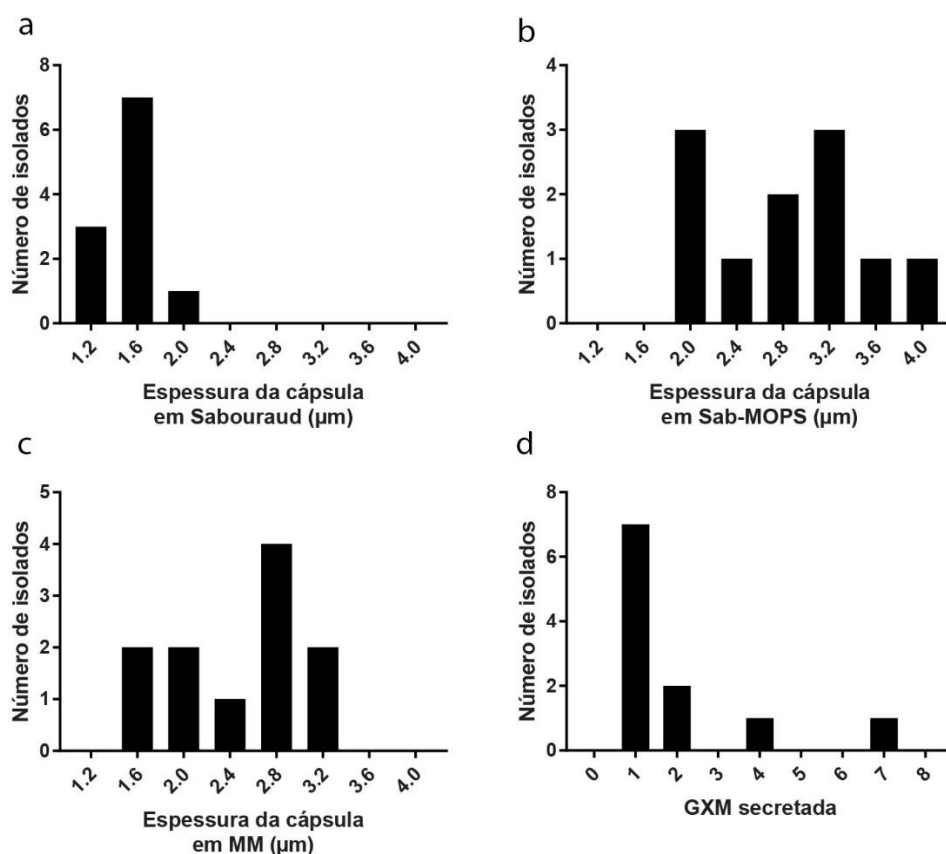


Figura 4 . Distribuição das medidas de espessura da cápsula e quantidade de GXM secretada.

Todos os isolados também foram capazes de produzir melanina. Entretanto, a intensidade de melanização (medida pelo parâmetro %Top+ da curva sigmoide) e a velocidade de melanização (medida pelos parâmetros %EC50+e %HillSlope+) variaram bastante entre os isolados (Figura 5). O Top, que pode ter valores entre zero (completamente branco) e 255 (completamente preto), variou de 117,8 a 235,5, com mediana de 192,7. Já o parâmetro EC50, que mede o tempo necessário para a colônia atingir metade da sua intensidade final de melanização, variou de 42,27 h a 166,2 h (mediana de 95,95 h).

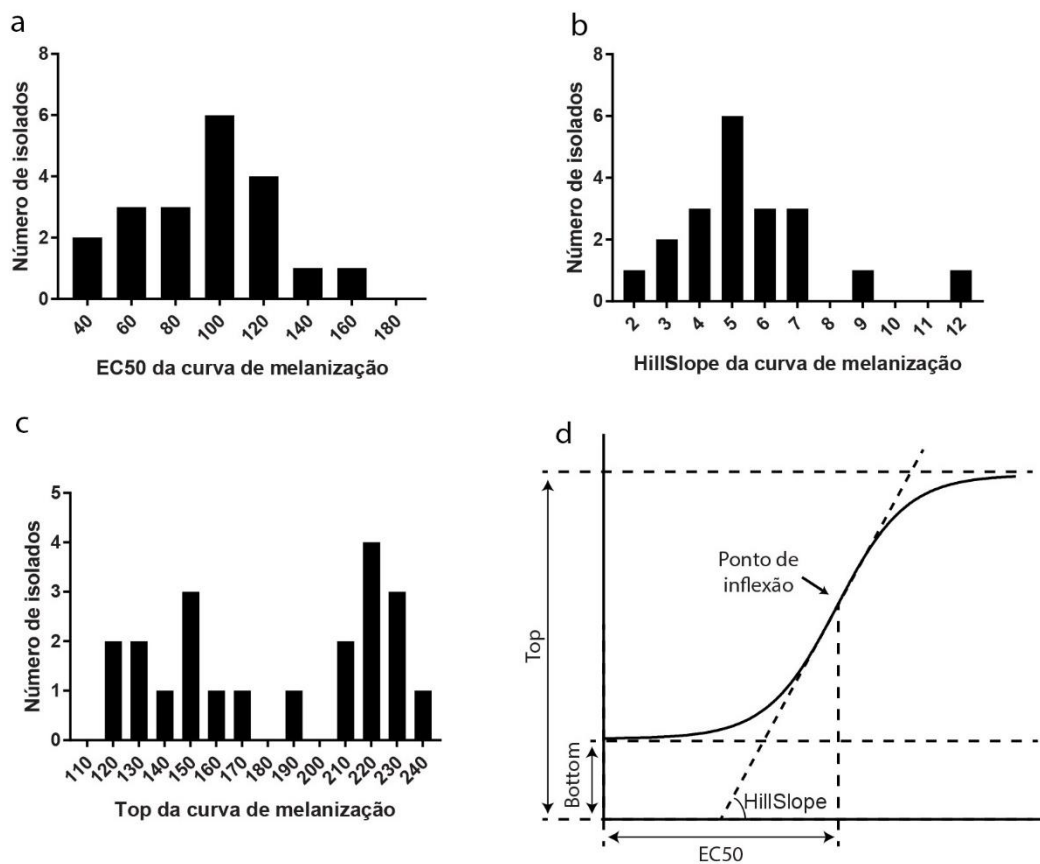


Figura 5 . Medidas de melanização dos isolados clínicos.

O gráfico (d) mostra esquema de curva sigmoide e aponta o significado dos parâmetros da regressão logística.

Oito dos 23 isolados foram utilizados em experimentos de infecção de larvas de *G. mellonella* (Figura 6). As medianas de sobrevivência das larvas infectadas variaram de 1 a 7,5 dias, com média de 4,6 dias.

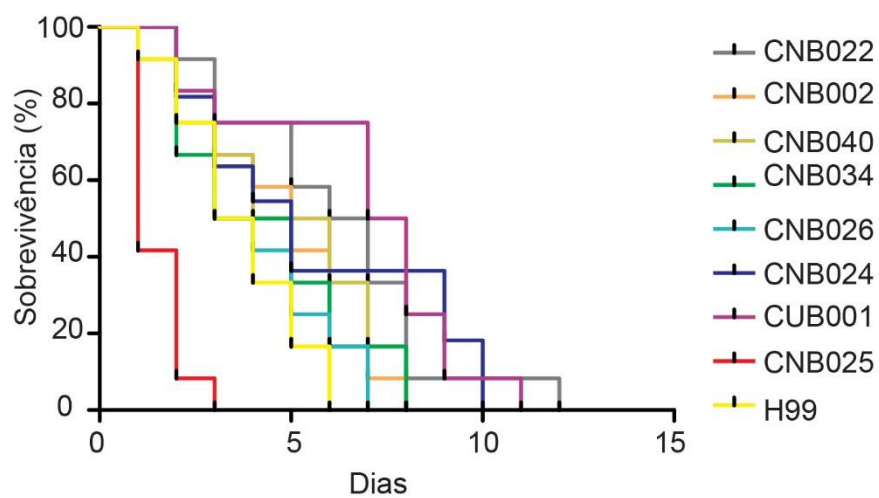


Figura 6 . Curvas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com os isolados clínicos.

Os dados de todos os experimentos laboratoriais feitos com esses isolados são mostrados nas tabelas a seguir: Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7.

Tabela 5 . Características dos isolados clínicos

Paciente	Isolado	Amostra ¹	Nanquim	Ágar Niger	Ágar CGB	Microscan/Vitek 2	Espectrometria
1	CNB013	LCR	Leveduras	Positivo	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
2	CNB015	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
3	CNB016	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
4	CNB020	LCR	Negativo	Positivo	<i>C. gattii</i>	*	<i>C. neoformans</i>
5	CNB021	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
6	CNB022	LBA	Negativo	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
7	CNB023	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
8	CNB024	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
9	CNB025	LA	Negativo	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
10	CNB026	SGN	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
11	CNB027	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
12	CNB029	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
13	CNB030	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	*
14	CNB032	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	Não realizado
15	CNB034	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	Não realizado
16	CNB035	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. neoformans</i>
17	CNB036	LCR	Leveduras	*	<i>C. gattii</i>	*	<i>C. neoformans</i>
18	CNB040	LCR	Leveduras	*	*	<i>C. neoformans</i>	*
19	CNB042	LCR	Leveduras	*	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	Não realizado
20	CSB002	LCR	Leveduras	*	*	<i>Cryptococcus</i> spp.	Não realizado
21	CSB003	LCR	Negativo	*	*	<i>Cryptococcus</i> spp.	Não realizado
22	CSB004	LCR	Leveduras	*	*	<i>Cryptococcus</i> spp.	Não realizado
23	CUB001	LCR	Negativo	*	<i>C. neoformans</i>	*	<i>C. uniguttulatus</i> ²

* Dados não disponíveis.

¹ LCR . líquido céfalo-raquidiano; LBA . lavado bronco-alveolar; LA . líquido ascético; SGN . sangue² Este isolado foi identificado por sequenciamento de ITS como *C. neoformans*

Tabela 6 . Medidas de interação patógeno-hospedeiro: recrutamento de LC3, fagocitose e cápsula

Isolado	Porcentagem LC3+		Fagocitose		Sabouraud ^e	Cápsula		
	- 1 ^a	Todos ^b	Porcentagem ^c	Índice ^d		Sab-MOPS ^f	MM ^g	GXM secretada ^h
CNB013	86,7%	54,1%	16,1%	*	*	*	*	*
CNB015	68,0%	60,0%	21,0%	2,41	1,74	3,30	3,15	2,41
CNB016	76,8%	43,2%	16,0%	*	*	*	*	*
CNB020	34,7%	8,2%	37,5%	*	*	*	*	*
CNB021	56,0%	37,0%	29,3%	0,56	1,68	3,84	2,98	0,56
CNB022	83,8%	57,6%	21,7%	0,84	1,48	2,52	1,88	0,84
CNB023	81,0%	50,0%	21,9%	*	*	*	*	*
CNB024	62,2%	39,8%	24,2%	1,22	1,72	3,11	2,63	1,22
CNB025	53,3%	20,0%	17,2%	1,31	1,51	2,76	2,34	1,31
CNB026	48,4%	31,2%	19,2%	0,75	1,24	2,00	1,55	0,75
CNB027	65,3%	57,9%	15,4%	*	*	*	*	*
CNB029	62,1%	37,9%	22,7%	*	*	*	*	*
CNB030	65,0%	51,0%	17,7%	*	*	*	*	*
CNB032	89,2%	50,6%	12,3%	*	*	*	*	*
CNB034	78,7%	42,7%	18,6%	3,51	1,24	1,83	1,72	3,51
CNB035	74,2%	44,1%	21,4%	*	*	*	*	*
CNB036	52,0%	38,0%	19,4%	*	*	*	*	*
CNB040	61,0%	51,0%	27,2%	1,09	1,50	1,92	1,85	1,09
CNB042	88,2%	81,7%	20,9%	*	*	*	*	*
CSB002	70,0%	62,0%	15,2%	2,38	1,31	3,37	2,86	2,38
CSB003	73,2%	60,8%	10,5%	*	*	*	*	*
CSB004	52,5%	39,4%	29,5%	*	*	*	*	*
CUB001	43,3%	32,0%	41,1%	7,43	1,89	3,59	3,07	7,43
H99	53,1%	40,8%	17,0%	1,00	1,43	2,63	2,62	1,00

^a Proporção de macrófagos que continham pelo menos uma levedura em fagossomo LC3-positivo dentre todos os macrófagos que haviam fagocitado pelo menos um fungo.

- ^b Proporção de macrófagos que continham todas as leveduras em fagossomos LC3-positivos dentre todos os macrófagos que haviam fagocitado pelo menos um fungo.
- ^c Proporção de macrófagos que internalizaram pelo menos um fungo dentre todos os macrófagos observados.
- ^d Número médio de células fúngicas internalizadas por macrófagos dentre todos os macrófagos que haviam fagocitado pelo menos um fungo.
- ^e Espessura média da cápsula das células do isolado crescido em meio Sabouraud, em μm .
- ^f Espessura média da cápsula das células do isolado crescido em meio indutor de cápsula Sab-MOPS, em μm .
- ^g Espessura média da cápsula das células do isolado crescido em meio indutor de cápsula MM, em μm .
- ^h Concentração de GXM no sobrenadante de culturas dos isolados em MM. Os valores foram normalizados pela concentração no sobrenadante de H99.

Tabela 7 . Medidas de interação patógeno-hospedeiro: recrutamento de LC3, sobrevida de *G. mellonella* e melanização

Isolado	Sobrevida de <i>G. mellonella</i> ^a	Melanização		
		EC50 ^b	HillSlope ^c	Top ^d
CNB013	*	137,1	11,86	151,6
CNB015	*	166,2	3,252	214,3
CNB016	*	124	5,487	192,7
CNB020	*	42,27	9,031	153,2
CNB021	*	88,61	4,861	211,4
CNB022	6,5	##	##	##
CNB023	*	96,13	6,195	224,9
CNB024	5	90,6	4,707	216,7
CNB025	1	55,21	4,995	230,7
CNB026	3,5	64,64	4,837	231,3
CNB027	*	112	7,328	134,6
CNB029	*	79,48	5,842	222
CNB030	*	120,7	2,275	161
CNB032	*	##	##	##
CNB034	4	96,32	3,417	120,9
CNB035	*	113,5	4,377	147,4
CNB036	*	64,22	3,749	228,2
CNB040	5	95,76	5,868	136,1
CNB042	*	102,8	6,743	133,3
CSB002	5	100,9	6,56	170,5
CSB003	*	##	##	117,8
CSB004	*	##	##	##
CUB001	7,5	82,95	5,258	222,7
H99	3,5	45,41	4,426	235,8

^a Mediana de sobrevida em dias de larvas de *G. mellonella* infectadas com células de cada isolado.

- ^b Parâmetro da regressão logística da curva de melanização. Tempo em horas para que a colônia deste isolado alcance metade da melanização máxima.
- ^c Parâmetro da regressão logística da curva de melanização. Inclinação da curva sigmoide no ponto de inflexão, indica quão rápida é a melanização.
- ^d Parâmetro da regressão logística da curva de melanização. Valor de cinza da assíntota superior da curva. Quanto mais alto, mais escura a colônia ficou ao final do processo de melanização.

Deteção e quantificação de fagocitose associada a LC3 (LAP)

O ensaio de imunofluorescência para detecção do marcador de autofagossomos LC3 foi realizado com 23 isolados clínicos do Distrito Federal. Em experimentos com todos os 23 isolados foi possível observar o recrutamento de LC3, o que indica a ocorrência de LAP; em alguns isolados esse fenômeno foi bastante comum, enquanto em outros foi menos frequente (Figura 7). A proporção de vacúolos LC3-positivos com cada isolado variou bastante e é mostrada na Figura 8. A porcentagem de macrófagos que continham pelo menos uma levedura em fagossomo LC3-positivo dentre todos os macrófagos que haviam fagocitado pelo menos um fungo variou entre 34,7% e 89,2%, com mediana de 65,2%. Já considerando somente macrófagos em que todas as leveduras fagocitadas se encontravam em fagossomos LC3-positivos, a proporção de macrófagos capazes de realizar LAP variou entre 8,2% e 81,7%, com mediana de 45,5%.

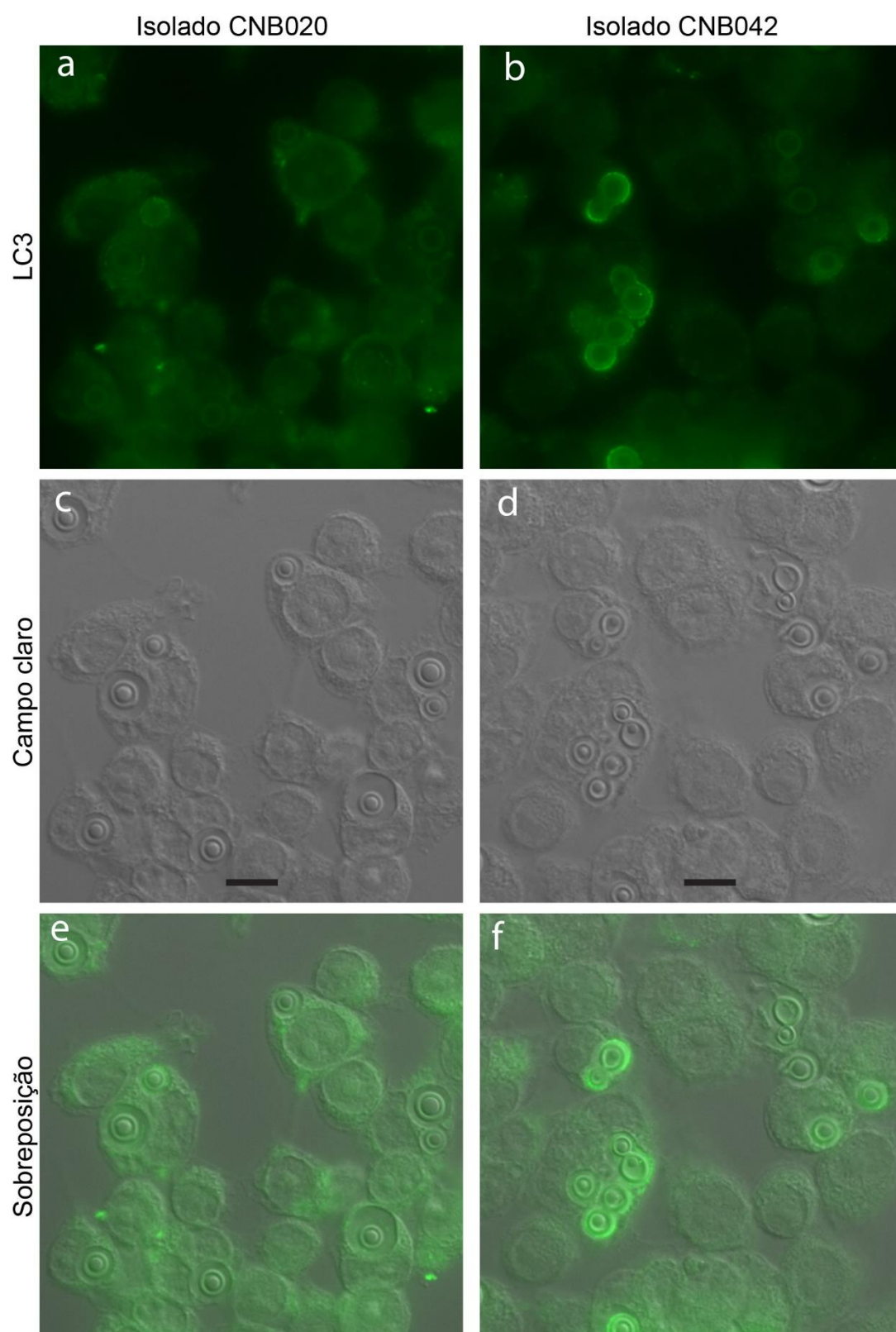


Figura 7 . Exemplos de campos de imunofluorescência com baixa (CNB020) e alta (CNB042) porcentagem de fagossomos LC3-positivos.

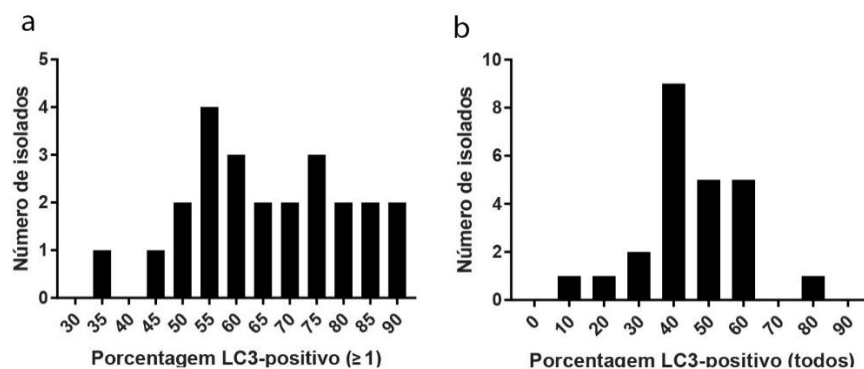


Figura 8 . Proporção de macrófagos capazes de realizar LAP.

Histogramas mostrando a distribuição das proporções de macrófagos capazes de recrutar LC3 para os fagossomos contendo cada um dos 23 isolados clínicos. O gráfico (a) é relativo a macrófagos que recrutaram LC3 para pelo menos um dos fagossomos contendo fungos em seu interior. O gráfico (b) mostra a distribuição de proporções de macrófagos em que todos os fungos internalizados estavam recobertos por LC3.

Correlações com os dados clínicos dos pacientes

Os dados de LAP mostrados acima foram correlacionados com algumas informações clínicas dos pacientes a partir dos quais os isolados clínicos foram obtidos (Figura 9). Em uma primeira análise, os pacientes foram separados entre os que morreram e os que receberam alta após tratamento adequado para criptococose. Não houve diferença na proporção de fagossomos LC3-positivos entre os dois grupos. Também não houve diferença na proporção de LAP entre os pacientes que apresentaram um fator de mau prognóstico (hipertensão intra-craniana) e os que não apresentaram esse critério de gravidade. Os três isolados obtidos de pacientes HIV-negativos foram alvos de LAP em proporções quase idênticas às dos isolados obtidos de pacientes HIV-positivos. Por fim, não houve correlação significativa entre a proporção de fagossomos LC3-positivos para um isolado e o tempo que o paciente do qual ele foi obtido demorou para morrer, dentro do grupo de isolados obtidos dos pacientes que sucumbiram à doença.

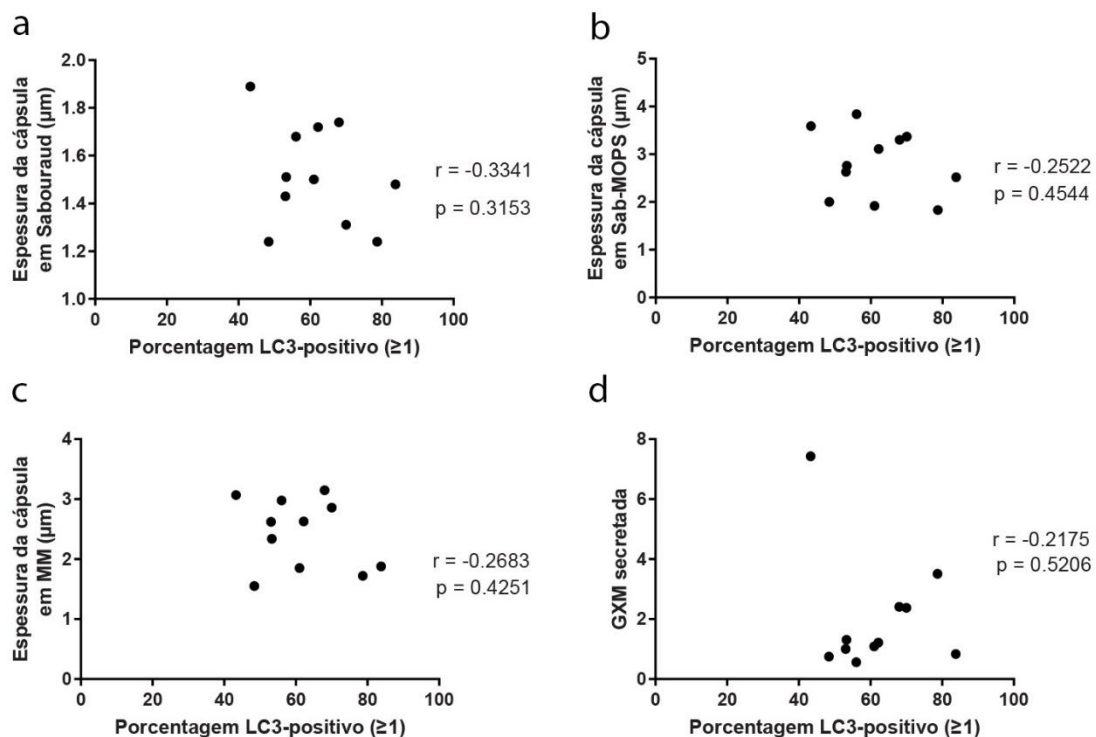


Figura 9 . Correlações entre proporção de LAP e dados clínicos dos pacientes dos quais isolados clínicos foram obtidos.

Correlações com características dos isolados

Também foram feitas correlações entre a capacidade de cada isolado de evadir do recrutamento de LC3 quando internalizado por macrófagos e medidas de virulência e interação patógeno hospedeiro desses isolados. Pode-se observar uma correlação inversa significativa entre a porcentagem de fagocitose e a porcentagem de fungos alvos de LAP (Figura 10). Em contraste, não houve correlação com o índice fagocítico.

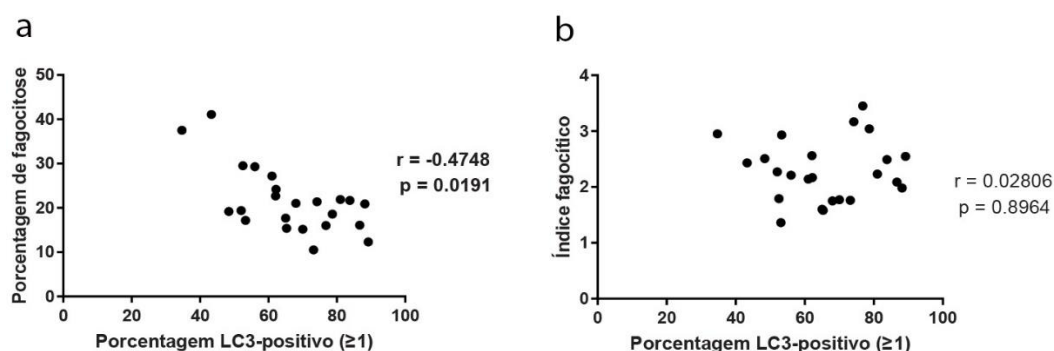


Figura 10 . Correlação entre medidas de fagocitose e recrutamento de LC3 para o fagossomo contendo fungos.

Com relação à cápsula, não houve correlação significativa entre a capacidade de evasão de LAP e a espessura da cápsula em nenhum dos três meios de cultura testados (Figura 11). Também não houve correlação com a quantidade de GXM liberada pelo fungo no meio de cultura.

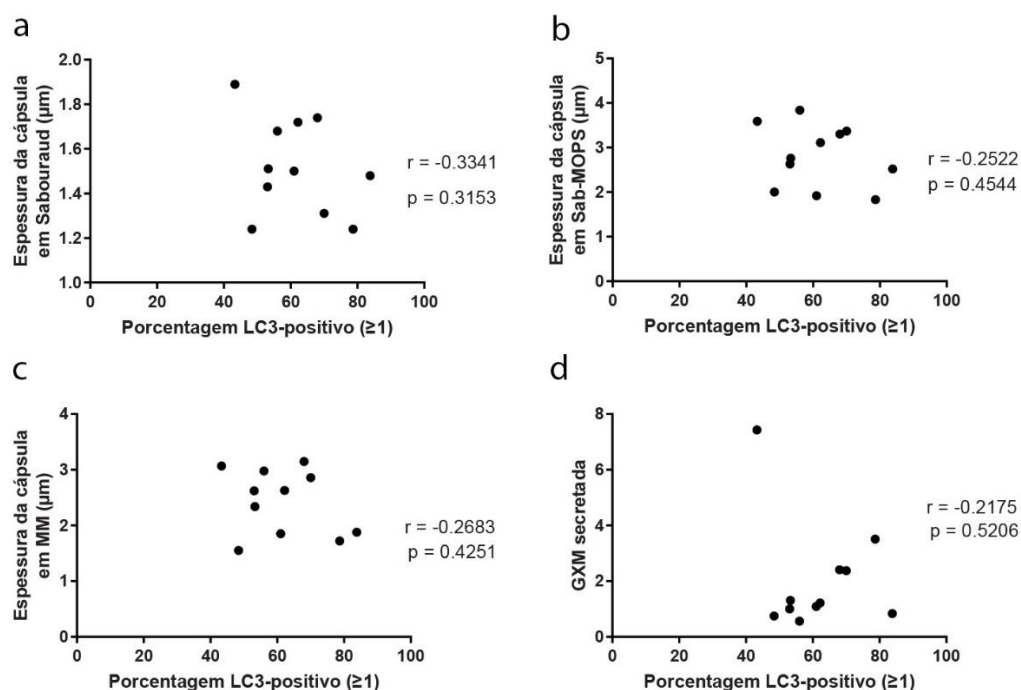


Figura 11 - Correlação entre medidas de cápsula e recrutamento de LC3 para o fagossomo contendo fungos.

Com relação à melanização, foi possível observar uma forte correlação positiva entre a proporção de fagossomos LC3-positivos e o parâmetro EC50 das curvas de melanização, indicando que quanto menor o tempo gasto pelo isolado para se melanizar, menor a proporção de fagossomos deste isolado que são alvos de LAP (Figura 12). Houve também uma correlação negativa significativa entre a proporção de fagossomos LC3-positivos e o parâmetro Top das curvas de melanização, indicando que quanto mais intensa a capacidade de um isolado de se melanizar, menor é a chance de suas células serem alvos de LAP após fagocitose por macrófagos. Não houve correlação significativa com o parâmetro HillSlope, que indica a velocidade de melanização das colônias.

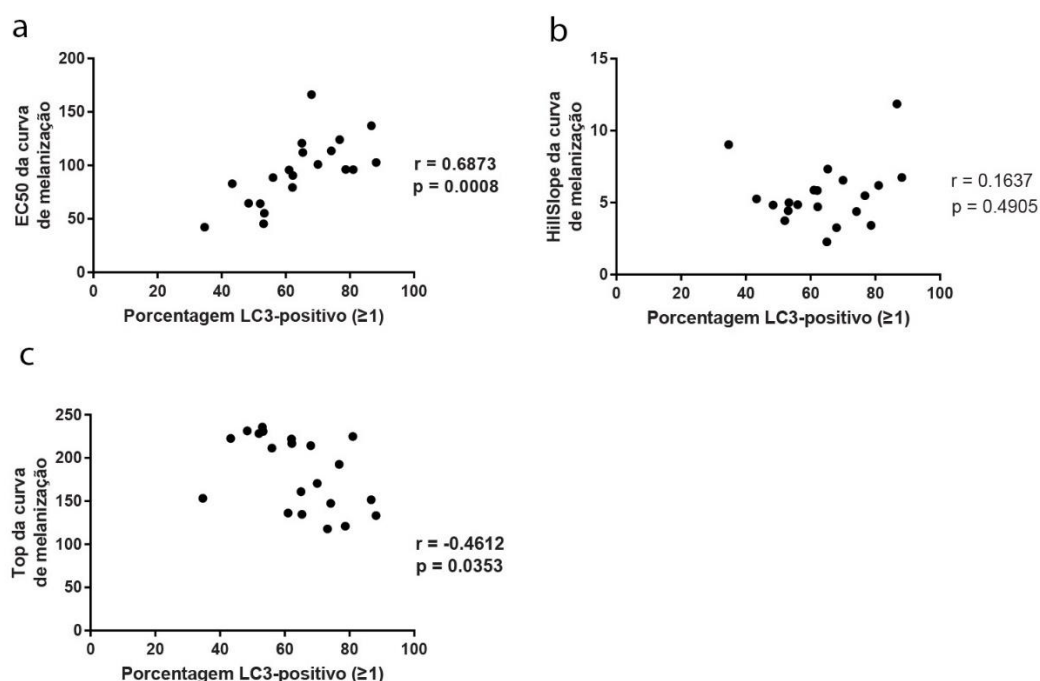


Figura 12 - Correlação entre medidas de melanização e recrutamento de LC3 para o fagossomo contendo fungos.

Por fim, não houve correlação entre a capacidade de evasão de LAP de um isolado com a sua virulência no modelo animal de *G. mellonella* (Figura 13).

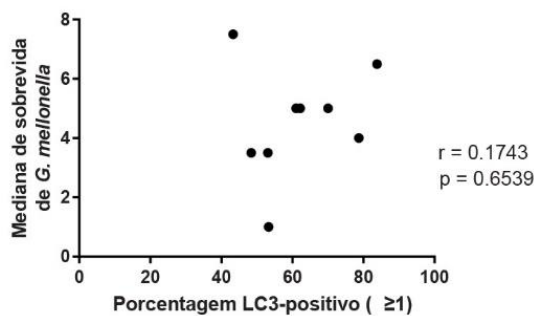


Figura 13 . Correlação entre mediana de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com isolados clínicos e recrutamento de LC3 para o fagossomo contendo fungos.

Discussão

Para testar se o recrutamento de LC3 para os fagossomos contendo fungos é importante na criptococose humana, foram feitas correlações entre dados clínicos dos pacientes dos quais os isolados foram obtidos e a proporção de macrófagos capazes de recrutar LC3 para fagossomos contendo os respectivos isolados. O racional do experimento é que *Cryptococcus* é capaz de evadir do processo de LAP, e que caso esse processo seja realmente importante na resposta imunitária de seres humanos ao fungo, os isolados capazes de evadir com mais eficiência sejam aqueles que causam doença mais severa. No entanto, nenhuma das correlações entre LAP e dados clínicos foi significativa. Isto pode significar que esse mecanismo imunitário antimicrobiano não tem um papel tão importante na criptococose humana. O número de isolados e pacientes testados, no entanto, não foi muito grande. Em análise de poder estatístico realizada antes deste e de outros experimentos da RCB-DF serem iniciados, determinou-se que $n = 16$ isolados proveria poder estatístico suficiente (0,8) para detectar correlações muito fortes ($r > 0,8$). Para ter poder igualmente bom para detectar correlações mais fracas ($r > 0,2$), o número de isolados a serem testados precisaria ser de 153.

Como existem muitos outros fatores que determinam a resposta a *Cryptococcus* e, portanto, a correlação entre LAP e desfecho da criptococose não deve ser muito forte, é provável que este resultado negativo seja resultado do baixo poder estatístico para detecção de correlação com $n = 23$ isolados.

Apesar desse resultado negativo com a correlação clínica, as correlações com parâmetros de virulência e interação patógeno-hospedeiro mostraram resultados bastante promissores. A autofagia e LAP comumente protegem o hospedeiro na maioria das infecções causadas por fungos, seja desencadeando ativação da resposta imune ou controlando a inflamação exagerada. Um primeiro achado interessante foi que a capacidade de evadir de LAP tem uma correlação inversa com a capacidade de evasão da fagocitose. O macrófago é a principal célula efetora contra o fungo, mas é também um nicho dentro do qual patógenos intracelulares facultativos de macrófagos como os do gênero *Cryptococcus* sobrevivem no hospedeiro. Uma interpretação possível destes resultados, portanto, é que os fungos que têm ferramentas mais eficientes para controlar LAP do hospedeiro também tenham mecanismos para controlar a capacidade de entrar na célula hospedeira.

Um segundo achado muito interessante é da correlação entre melanização e evasão de LAP. Quanto mais rápida e mais intensa a melanização de um isolado, menos a proporção de leveduras dele que vão parar em fagossomos LC3-positivos após a fagocitose. Um estudo analisando como a presença de melanina no fungo *Aspergillus fumigatus* mostrou o recrutamento de LC3 para o fagossomo contendo conídios deste fungo é significativamente bloqueado por melanina (Akoumianaki et al., 2016). Este trabalho é o primeiro a demonstrar semelhante papel de evasão da LAP para a melanina em *C. neoformans*.

Conclusões

- Macrófagos foram capazes de recrutar LC3 para os fagossomos contendo todos os isolados de *Cryptococcus*. Entretanto, nem todas as leveduras fagocitadas foram parar em fagossomos LC3-positivos. Além disso, a eficácia deste processo . medida pela proporção de fagossomos LC3-positivos . variou bastante na resposta de macrófagos contra os diferentes isolados. Isso sugere que *C. neoformans* tenha mecanismos para bloquear ou diminuir o processo de LAP desencadeado por macrófagos do hospedeiro.
- A capacidade de evadir do processo de LAP parece estar relacionada negativamente à capacidade de evasão de outro mecanismo imunitário, a fagocitose.
- A capacidade de evasão de LAP também está relacionada com o processo de melanização, o que sugere um novo papel para este pigmento na relação entre *Cryptococcus* e macrófagos.
- Não foi possível observar nenhuma correlação significativa entre a proporção de fagossomos LC3-positivos e aspectos de gravidade da criptococose nos pacientes dos quais os isolados foram obtidos. Isso pode sugerir que o processo de LAP não é tão importante na resposta imunitária de seres humanos a *Cryptococcus*. Entretanto, o baixo número de isolados e a grande variabilidade no diagnóstico e tratamento dos pacientes indica não ser possível ainda tirar uma conclusão adequada sobre isso.

Referências bibliográficas

- Akoumianaki, T., Kyrmizi, I., Valsecchi, I., Gresnigt, M. S., Samonis, G., Drakos, E., & Chamilos, G. (2016). Aspergillus Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. *Cell Host & Microbe*, 19(1), 79. 90. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.002>
- Almeida, F., Wolf, J. M., & Casadevall, A. (2015). Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 14(12), 1173. 1185. <https://doi.org/10.1128/EC.00103-15>
- Anthony, R. M., Urban, J. F., Alem, F., Hamed, H. A., Rozo, C. T., Boucher, J.-L., & Gause, W. C. (2006). Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature Medicine*, 12(8), 955. 960. <https://doi.org/10.1038/nm1451>
- Arendrup, M. C., Bille, J., Dannaoui, E., Ruhnke, M., Heussel, C.-P., & Kibbler, C. (2012). ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. *Bone Marrow Transplantation*, 47(8), 1030. 1045. <https://doi.org/10.1038/bmt.2011.246>
- Arora, S., Hernandez, Y., Erb-Downward, J. R., McDonald, R. A., Toews, G. B., & Huffnagle, G. B. (2005). Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(10), 6346. 6356. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879135>
- Beltrán-García, M. J., Prado, F. M., Oliveira, M. S., Ortiz-Mendoza, D., Scalfo, A. C., Pessoa, A., & Mascio, P. Di. (2014). Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black Sigatoka disease of bananas. *PloS One*, 9(3), e91616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091616>

- Boulware, D. R. (2011). *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast. The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 11). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70140-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70140-2)
- Boulware, D. R., Meza, D. B., Muzoora, C., Rolfes, M. A., Huppler Hullsiek, K., Musubire, A., & Meintjes, G. (2014). Timing of Antiretroviral Therapy after Diagnosis of Cryptococcal Meningitis. *New England Journal of Medicine*, 370(26), 2487. 2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312884>
- Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68(2), 443. 448. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639402>
- DeSouza, C. A., Kronstad, J. W., Taylor, G., Warren, R., Yuen, M., Hu, G., & Cuomo, C. A. (2011). Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio*, 2(1), e00342-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00342-10>
- Dan, J. M., Kelly, R. M., Lee, C. K., & Levitz, S. M. (2008). Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infection and Immunity*, 76(6), 2362. 2367. <https://doi.org/10.1128/IAI.00095-08>
- Davis, M. J., Tsang, T. M., Qiu, Y., Dayrit, J. K., Freij, J. B., Huffnagle, G. B., & Olszewski, M. A. (2013). Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio*, 4(3), e00264-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00264-13>
- Ding, A. H., Nathan, C. F., & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(7), 2407. 2412. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3139757>

- Doering, T. L. (2009). How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*, 63, 223-247. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162753>
- Dromer, F., Mathoulin-Pélissier, S., Launay, O., Lortholary, O., & Group, the F. C. S. (2007). Determinants of Disease Presentation and Outcome during Cryptococcosis: The CryptoA/D Study. *PLoS Medicine*, 4(2), e21. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040021>
- Eisenman, H. C., & Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 931-940. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3777-2>
- Eisenman, H. C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G., & Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology*, 153(12), 3954-3962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011049-0>
- Feldmesser, M., Tucker, S., & Casadevall, A. (2001). Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*, 9(6), 273-278. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390242>
- Franzot, S. P., Salkin, I. F., & Casadevall, A. (1999). *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 838-840. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9986871>
- Frases, S., Nimrichter, L., Viana, N. B., Nakouzi, A., & Casadevall, A. (2008). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 319-327. <https://doi.org/10.1128/EC.00378-07>
- Garcia-Rivera, J., Eisenman, H. C., Nosanchuk, J. D., Aisen, P., Zaragoza, O.,

- Moadel, T., & Casadevall, A. (2005). Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. *Fungal Genetics and Biology*, 42(12), 989-998. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2005.09.003>
- Gates, M. A., & Kozel, T. R. (2006). Differential localization of complement component 3 within the capsular matrix of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 74(6), 3096-3106. <https://doi.org/10.1128/IAI.01213-05>
- Geng, J., & Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects*, Review Series, 9(9), 859-864. <https://doi.org/10.1038/emboor.2008.163>
- Giles, S. S., Dagenais, T. R. T., Botts, M. R., Keller, N. P., & Hull, C. M. (2009). Elucidating the Pathogenesis of Spores from the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(8), 3491-3500. <https://doi.org/10.1128/IAI.00334-09>
- Govender, N. P., & Dlamini, S. (2014). Management of HIV-associated cryptococcal disease in South Africa. *South African Medical Journal*, 104(12), 896. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.9070>
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., & Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 16-48. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2015.02.009>
- Idnurm, A., Reedy, J. L., Nussbaum, J. C., & Heitman, J. (2004). *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 420-429. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.420-429.2004>
- Johnston, S. A., & May, R. C. (2013). *Cryptococcus* interactions with

- macrophages: Evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cellular Microbiology*, 15(3), 403. 411. <https://doi.org/10.1111/cmi.12067>
- Kang, B. S., Kwon-Chung, K. J., Petter, R., Davis, B. J., & Boekhout, T. (2001). A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59 b. *Microbiology*, 147(8), 2029. 2036. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2029>
- Kozel, T. R., & Bauman, S. K. (2012). CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 6(3), 245. 251. <https://doi.org/10.1517/17530059.2012.681300>
- Kraus, P. R., Boily, M.-J., Giles, S. S., Stajich, J. E., Allen, A., Cox, G. M., & Heitman, J. (2004). Identification of *Cryptococcus neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1249. 1260. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1249-1260.2004>
- Kumar, P., Yang, M., Haynes, B. C., Skowrya, M. L., & Doering, T. L. (2011). Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. *Curr Opin Struct Biol*, 21(5), 597. 602. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.006>
- Kwon-Chung, K. J. (n.d.). A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68(4), 943. 946. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/790173>
- Kwon-Chung, K. J. (2011). *Filobasidiella* Kwon-Chung (1975). *The Yeasts*, 1443. 1455. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00114-2>
- Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z. A., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y.-S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>

- Kwon-Chung, K. J., & Varma, A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, 6(4), 574. 587. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x>
- Lee, J.-K., Jung, H.-M., & Kim, S.-Y. (2003). 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3427. 3434. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3427-3434.2003>
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, 120(2), 159. 162. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.005>
- Levitz, S. M., Nong, S. H., Seetoo, K. F., Harrison, T. S., Speizer, R. A., & Simons, E. R. (1999). *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun*, 67(2), 885. 890. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916104>
- Levitz, S. M., Nong, S., Mansour, M. K., Huang, C., & Specht, C. A. (2001). Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18), 10422. 10427. <https://doi.org/10.1073/pnas.181331398>
- Levitz, S. M., & Tabuni, A. (1991). Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirements for multiple complement receptors and actin. *Journal of Clinical Investigation*, 87(2), 528. 535. <https://doi.org/10.1172/JCI115027>
- Lin, X., & Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*, 60, 69. 105. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>
- Liu, O. W., Chun, C. D., Chow, E. D., Chen, C., Madhani, H. D., & Noble, S.

- M. (2008). Systematic Genetic Analysis of Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell*, 135(1), 174. 188. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.046>
- Lu, L., Bonham, C. A., Chambers, F. G., Watkins, S. C., Hoffman, R. A., Simmons, R. L., & Thomson, A. W. (1996). Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(8), 3577. 3586. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8871658>
- Malik, R., Krockenberger, M. B., Cross, G., Doneley, R., Madill, D. N., Black, D., & Love, D. N. (2003). Avian cryptococcosis. *Medical Mycology*, 41(2), 115. 124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12964843>
- Mansour, M. K., Latz, E., & Levitz, S. M. (2006). *Cryptococcus neoformans* glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(5), 3053. 3061. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16493064>
- McClelland, E. E., Bernhardt, P., & Casadevall, A. (2006). Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. *Infection and Immunity*, 74(3), 1500. 1504. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1500-1504.2006>
- Michal A Olszewski; Yanmei Zhang; Gary B Huffnagle. (2015). Anti-cryptococcal Mechanisms of Host Defense Rapid Recognition & The Innate Response. Retrieved July 20, 2018, from https://www.medscape.com/viewarticle/727725_3
- Micol, R., Lortholary, O., Sar, B., Laureillard, D., Ngeth, C., Dousset, J.-P., & Fontanet, A. (2007). Prevalence, Determinants of Positivity, and Clinical Utility of Cryptococcal Antigenemia in Cambodian HIV-Infected Patients.

- JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 45(5), 555. 559. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31811ed32c>
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21(22), 2861. 2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Odom, A., Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D. L., Perfect, J., & Heitman, J. (1997). Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The EMBO Journal*, 16(10), 2576. 2589. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2576>
- Olszewski, M. A., Noverr, M. C., Chen, G.-H., Toews, G. B., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Huffnagle, G. B. (2004). Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American Journal of Pathology*, 164(5), 1761. 1771. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63734-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63734-0)
- Osterholzer, J. J., Surana, R., Milam, J. E., Montano, G. T., Chen, G.-H., Sonstein, J., & Olszewski, M. A. (2009). Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *The American Journal of Pathology*, 174(3), 932. 943. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080673>
- Panepinto, J., Komperda, K., Frases, S., Park, Y.-D., Djordjevic, J. T., Casadevall, A., & Williamson, P. R. (2009). Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 71(5), 1165. 1176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06588.x>
- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), 525. 530. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac>
- Perfect, J. R. (2006). *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot.

- FEMS Yeast Research*, 6(4), 463. 468. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00051.x>
- Perfect, J. R., & Casadevall, A. (2002). Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 16(4), 837. 74, v. vi. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512184>
- Pinner, R. W., Hajjeh, R. A., & Powderly, W. G. (1995). Prospects for preventing cryptococcosis in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, 21 Suppl 1, S103-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8547496>
- Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., & Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 17(8), 873. 881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
- Rosa e Silva, L. K., Staats, C. C., Goulart, L. S., Morello, L. G., Pelegri-nelli Fungaro, M. H., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2008). Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Research in Microbiology*, 159(3), 221. 229. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.006>
- Rosa, L. H., Almeida Vieira, M. de L., Santiago, I. F., & Rosa, C. A. (2010). Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1), no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00872.x>
- Sabiiti, W., & May, R. C. (2012). Capsule Independent Uptake of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* into Brain Microvascular Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 7(4), e35455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035455>

- Severo, C. B., Xavier, M. O., Gazzoni, A. F., & Severo, L. C. (n.d.). Cryptococcosis in children. *Paediatric Respiratory Reviews*, 10(4), 166. 171. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2009.06.009>
- Shao, X., Mednick, A., Alvarez, M., van Rooijen, N., Casadevall, A., & Goldman, D. L. (2005). An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(5), 3244. 3251. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.5.3244>
- Swinne, D., Deppner, M., Laroche, R., Floch, J. J., & Kadende, P. (1989). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). *AIDS*, 3(6), 389. 390. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2502153>
- Zhdanova, N. N., Zakharchenko, V. A., Vember, V. V., & Nakonechnaya, L. T. (2000). Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research*, 104(12), 1421. 1426. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002756>
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., & Williamson, P. R. (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity*, 69(9), 5589. 5596. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001>